



UNIVERSIDADE DE  
**VASSOURAS**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Mestrado Profissional em Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Medicina  
Veterinária

**CARLOS ALBERTO SILVEIRA JÚNIOR**

## **RELATÓRIO TÉCNICO/CIENTÍFICO:**

**Pré centrifugação de sêmen de garanhões  
mangalarga marchador com baixa motilidade  
visando diminuir o estresse oxidativo e melhorar a  
cinética espermática no processo de congelação**

Vassouras  
2019

**CARLOS ALBERTO SILVEIRA JÚNIOR**

## **RELATÓRIO TÉCNICO/CIENTÍFICO:**

**Pré centrifugação de sêmen de garanhões mangalarga marchador com baixa motilidade visando diminuir o estresse oxidativo e melhorar a cinética espermática no processo de congelção**

Relatório técnico/científico apresentado a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação e Pesquisa / Coordenação do Mestrado Profissional em Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Medicina Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Gustavo Mendes Gomes, Universidade de Vassouras  
Doutor pela (UNESP – Botucatu - Brasil)

Vassouras  
2019

**CARLOS ALBERTO SILVEIRA JÚNIOR**

**RELATÓRIO TÉCNICO/CIENTÍFICO:  
Pré centrifugação de sêmen de garanhões mangalarga  
marchador com baixa motilidade visando diminuir o  
estresse oxidativo e melhorar a cinética espermática no  
processo de congelação**

Relatório técnico/científico apresentado a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação e Pesquisa / Coordenação do Mestrado Profissional em Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Medicina Veterinária da Universidade de Vassouras, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Diagnóstico Clínico e Laboratorial em Medicina Veterinária.

Banca:

Orientador:

Prof. Dr. Gustavo Mendes Gomes, Universidade de Vassouras  
Doutor pela (UNESP – Botucatu - Brasil)

Prof. Dr. Marcus Antônio Peçanha Barreto, UENF  
Doutor pela (UENF – Campos dos Goytacases – Brasil)

Prof. Dr. Eduardo Tavares Lima Trajano, Universidade de Vassouras  
Doutor pela (UERJ – Rio de Janeiro – Brasil)

Prof. Dr. André Maciel Crespilho, UNISA  
Doutor pela UNESP – Botucatu – Brasil)

VASSOURAS  
2019

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carlos Alberto (*In Memoriam*) e Josette, meus maiores exemplos de Família, Vida e Dedicção, sempre presentes em todos os momentos.

À minha esposa, Adriana, sempre companheira de todos os momentos, sempre ao meu lado nas lutas e nos sonhos diários, com insistência, persistência e coerência.

Aos meus filhos, Pedro, Beatriz, Alice e Luiza, pela inspiração, carinho, incentivo e ensinamentos.

Aos meus irmãos, Karla e João Pedro, pelo suporte profissional, companheirismo e amizade fraterna.

À minha avó, Odette (*In Memoriam*), que sempre iluminou minhas decisões com seus discernimentos, sua espiritualidade e bondade.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus amigos, Bigu, Letícia e André, pelo incentivo, amizade, paciência e dedicação.

Aos Professores envolvidos nesta etapa do mestrado, em especial Gustavo Gomes, Letícia Gomes e André Crespilho, pelos ensinamentos, dedicação e oportunidade em adquirir novos conhecimentos.

Aos companheiros do haras Laranjeiras, em especial, Eurico, Paulinho e Herivelton, pelo compromisso, disponibilidade e boa vontade.

Ao amigo Galopante Barretão, pela parceria profissional e boa vontade em participar da banca examinadora.

## RESUMO

**JUNIOR, C. A. S.,** PRÉ CENTRIFUGAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES MANGALARGA MARCHADOR COM BAIXA MOTILIDADE VISANDO DIMINUIR O ESTRESSE OXIDATIVO E MELHORAR A CINÉTICA ESPERMÁTICA NO PROCESSO DE CONGELAÇÃO, 32p.

A raça Mangalarga Marchador é uma das principais raças em crescimento no uso da biotecnologia da reprodução, sendo que, a utilização do sêmen congelado é uma importante etapa no processo biotecnológico, porém, muitos garanhões da raça não respondem de forma satisfatória frente ao processo de criopreservação. Vários fatores estão envolvidos que podem levar a essa intolerância. Por este motivo, o objetivo do presente estudo a campo foi verificar se uma inovação técnica através da pré-centrifugação do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador com baixo percentual de motilidade espermática poderia diminuir o estresse oxidativo e desta forma melhorar a cinética espermática no processo de congelação de sêmen. Para o trabalho, foram utilizados 10 garanhões, divididos em dois grupos. Grupo I: cinco garanhões com motilidade total igual ou inferior 50% e grupo II: cinco garanhões com motilidade total superior a 50%, selecionados e avaliados por microscopia subjetiva. Para avaliação das amostras seminais foi realizada análise computadorizada de cinética espermática pelo sistema ISAS® V.1.2 (Proiser, Valencia, Espanha), análise e quantificação do estresse oxidativo pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e integridade de membrana plasmática empregando as sondas fluorescentes iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína. Os resultados dos exames realizados demonstraram que a pré-centrifugação não apresentou diferença estatística em relação à indução de lesões de membrana plasmática ou, de defeitos morfológicos quando comparadas as duas técnicas. Porém, foi observado uma melhora para determinados garanhões quando analisadas minuciosamente individuo por individuo, sinalizando desta forma, um favorecimento deste novo protocolo para determinados animais, sugerindo a continuação do estudo com o aumento do número de garanhões para confirmação mais fidedigna dos resultados e conclusões.

**Palavras-chave:** cinética espermática, criopreservação, estresse oxidativo, garanhão, sêmen

## **ABSTRACT**

**JUNIOR, C.A.S., SEMEN PRE-CENTRIFUGATION OF MANGALARGA MARCHADOR STALLIONS WITH LOW MOTILITY, TO REDUCE OXIDATIVE STRESS AND IMPROVE SPERMATIC KINETIC ON FREEZING PROCESS, 31p.**

The Mangalarga Marchador breed is one of the main growing breeds in the use of breeding biotechnology, being that the use of frozen semen is an important step in the biotechnological process, however, many stallions of the breed do not respond satisfactorily to the cryopreservation process. Several factors are involved in this intolerance. For this reason, the objective of the present field study was to verify if a technical innovation through the pre-centrifugation of the Mangaranga Marchador stallion semen with low percentage of sperm motility could decrease oxidative stress and thus improve the spermatocinetics in the process of semen freezing. For the work, 10 stallions were used, divided into two groups. Group I: five stallions with total sperm motility equal to or less than 50% and group II: five stallions with total sperm motility greater than 50%, selected and evaluated by subjective microscopy. For the evaluation of the seminal samples, a computerized analysis of sperm kinetics by the ISAS® V.1.2 system (Proiser, Valencia, Spain), oxidative stress analysis and quantification of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and plasma membrane integrity was performed the proton iodide fluorescent probes and carboxyfluorescein diacetate. The results of the tests showed that pre-centrifugation did not present statistical difference in relation to the induction of plasma membrane lesions or of morphological defects when comparing the two techniques. However, an improvement was observed for certain stallions when analyzed individually by individual, signaling in this way, a favor of this new protocol for certain animals, suggesting the continuation of the study with the increase of the number of stallions for more reliable confirmation of the results and conclusions.

Key words: cryopreservation, oxidative stress, semen spermatocinetics, stallion

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	OBJETIVOS.....	12
3	DESCRIÇÃO TÉCNICA DO PRODUTO.....	13
4	POSSÍVEIS APLICABILIDADES DO PRODUTO.....	25
5	CONCLUSÃO.....	26
6	REFERÊNCIAS.....	27
7	ANEXOS.....	31



## 1. INTRODUÇÃO

A equinocultura vem ganhando um importante espaço no agronegócio, no esporte, no contexto social, no lazer, com isso, gerando milhares de empregos diretos e indiretos. A raça Mangalarga Marchador é uma raça Brasileira e a maior raça de cavalos da América Latina. Um dos principais motivos do número de animais se faz presente pelo crescimento no uso da biotecnologia da reprodução, sendo que, a utilização do sêmen congelado é uma importante etapa no processo biotecnológico, possibilitando o armazenamento do sêmen como “seguro” genético em casos de lesões irreversíveis ou morte do garanhão, quebra de barreiras geográficas e utilização do sêmen com o garanhão em atividade esportiva. Inclusive existe um interesse cada vez maior em criadores desta raça em exportar sêmen tanto para os EUA e Europa, ou seja, é extremamente importante o sêmen congelado para esta finalidade de expansão da raça para outros países.

Na espécie equina, devido aos métodos de seleção genética impostos a esta espécie, valorizando aspectos fenotípicos frente à qualidade reprodutiva, existe uma grande variabilidade individual quanto às respostas à criopreservação espermática, refletindo em garanhões com boa resistência e outros considerados intolerantes ao processo de refrigeração e/ou congelação (BRITO et al., 2007).

Garanhões das raças germânicas de hipismo e garanhões quarto de milha possuem melhores parâmetros espermáticos após a descongelação do sêmen quando comparado com outras raças, especialmente a raça Mangalarga Marchador e cavalos de origem ibéricas. Um dos fatores relacionados a resistência ao processo de criopreservação é a composição de membrana plasmática dos espermatozóides, que está diretamente relacionada com a sua fluidez e integridade desta membrana. (ALVARENGA et al 1996, 2003 e 2005).

Garanhões Mangalarga Marchador naturalmente possuem menor produção espermática e podem ser considerados como produtores de sêmen com menor congelabilidade em relação a outras raças criadas no país (GOMES E GOMES, 2009).

O principal fator limitante para o uso do sêmen criopreservado de garanhões está relacionado com uma grande variação observada entre indivíduos na habilidade dos espermatozóides sobreviverem ao processo de congelação.

Muitos reprodutores apresentam baixa motilidade espermática e integridade celular após descongelação e, conseqüentemente, índices de fertilidade insatisfatórios, não havendo até o momento técnicas e protocolos ideais disponíveis para criopreservar o material genético da maioria destes animais (GOMES ET AL., 2002a).

Amman e Pickett (1987) destacam que, além dos fatores raciais, podem ser observadas grandes diferenças individuais dentro de uma mesma raça.

Entretanto, existem algumas dificuldades no processo de congelamento sendo a centrifugação uma etapa essencial para o processo de criopreservação do sêmen equino, permitindo concentrar a fração espermática e promover separação de boa parte do plasma seminal do ejaculado, trazendo benefícios sobretudo para garanhões que produzem espermatozóides com reduzida motilidade progressiva (GIBB, 2016).

O fluido seminal é um veículo necessário para o movimento dos espermatozóides no trato genital de machos e fêmeas. O plasma seminal facilita o transporte, a proteção e a nutrição dos espermatozóides no trato genital feminino, porém existe algumas evidências de que a fração rica em espermatozóides do ejaculado equino parece ser mais adequada a congelamento do que o ejaculado total ou as frações com baixa motilidade espermática (KATILA e KARESKOSKI, 2006).

Segundo Amann e Pickett (1987) a centrifugação não é um processo inútil e os efeitos deletérios podem ser minimizados adotando-se uma baixa força de centrifugação e diluindo-se os espermatozóides antes de centrifugá-los.

A centrifugação espermática antes do resfriamento, quando comparada à centrifugação após o resfriamento, foi mais eficiente em preservar a motilidade progressiva do sêmen equino avaliada após o descongelamento (SQUIRES et al, 2000)

O espermatozóide é uma célula aeróbica, sendo assim, necessita do oxigênio para manutenção de suas funções. Porém, quando presente em concentrações elevadas formam a Espécie Reativa ao Oxigênio (ROS) (AITKEN et al, 2006).

Bedford et al. (1995a) relataram que a centrifugação se torna essencial quando o diluidor a ser utilizado contém gema de ovo. De acordo com os autores, parece ocorrer uma interação negativa entre o plasma seminal e a gema de ovo que leva à depressão da motilidade mais evidente após longos períodos de estocagem. Essa interação não prejudica somente a motilidade espermática, mas também interfere negativamente nos índices de fertilidade.

Estudos evidenciaram ainda que a centrifugação pode ser crítica para a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides, devido à indução da peroxidação dos lipídios (PARINAUD et al., 1997). Estes fatos foram evidenciados mais recentemente por Henkel (2011) mostrando que a centrifugação desencadeou a liberação de Radicais Oxidativos de Oxigênio (ROS) oriundos de espermatozóides mortos, leucócitos e células germinativas, sendo que estes ROS causariam danos a membrana dos espermatozóides

A produção excessiva de ROS, além da capacidade antioxidante do plasma seminal, determina o estresse oxidativo, que causa disfunções na própria célula espermática através de diferentes mecanismos, como a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática, diminuição do metabolismo, da motilidade e da capacidade fecundante (GERRA; EVANS; MAXXWELL, 2004)

O processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de ROS, que ao ter contato com os ácidos decosaheptaenóicos da membrana espermática, retiram um hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez irá agir em outro ácido decosaheptaenóico. Esse processo desencadeia a cascata de peroxidação, causando alterações estruturais na membrana plasmática, com perda de fluidez e da capacidade de regular a concentração intercelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático, mudanças no metabolismo celular e por fim, perda da capacidade de fertilização do espermatozóide (AITKEN; KRAUSZ, 2001)

Maiores concentrações de células poderiam acarretar em menor resistência ao estresse oxidativo devido ao aumento proporcional de células anormais, pois sabe-se que a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é maior na presença de células danificadas pela congelação, não-viáveis ou morfologicamente anormais. (BALL, 2001)

Os processos de congelação e descongelação provocam, entre outras alterações, desestabilização das membranas devido à reorganização e perda de lipídios conjuntamente com peroxidação lipídica em decorrência da ação de espécies reativas de oxigênio. Esses eventos podem afetar funções espermáticas como motilidade, resposta ao estresse osmótico e mecanismos de sinalização, comprometendo a habilidade dos espermatozóides de alcançarem, ligarem e reagirem com a zona pelúcida (RICKER et al, 2006)

Há uma relação entre concentração espermática e diversas características de cinética do espermatozóide no sêmen equino congelado, na qual a utilização de concentrações espermáticas mais baixas proporcionam um efeito benéfico na qualidade seminal pós-descongelação. (PAPA et al, 2011)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral:**

O objetivo do presente estudo a campo foi verificar se uma inovação técnica através da pré-centrifugação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador com baixo percentual de motilidade poderia diminuir o estresse oxidativo e desta forma melhorar a cinética espermática no processo de congelamento de sêmen e por consequência melhorar a qualidade do sêmen após a descongelamento.

### **2.2. Específicos:**

- Verificar se a retirada através da pré centrifugação dos espermatozoides não viáveis ou mortos, cristais, células de descamação, hemácias, células primordiais, e sujidades contribuiu para diminuir o estresse oxidativo, desta forma, melhorando a cinética espermática no sêmen congelado de alguns garanhões.

- Avaliar se técnica empregada aumenta a porcentagem de integridade da membrana plasmática, melhora a cinética espermática do sêmen congelado.

### 3. DESCRIÇÃO TÉCNICA DO PRODUTO

#### 3.1. Animais e critérios de inclusão:

Este trabalho foi submetido a avaliação e posterior aprovação pela Comissão de Ética de Uso Animal (CEUA) da Universidade de Vassouras, onde foi gerado o protocolo de número 043/2017.

Foram utilizados 10 garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 04 e 10 anos, com média de peso de 350kg, alojados em um haras no município de Areal-RJ. Os animais foram mantidos com o mesmo manejo, sendo que, alojados em baias durante à noite e soltos em piquetes individuais durante o dia e alimentados com concentrado, capim picado, feno, sal mineral e água “ad libitum”.

O sêmen dos garanhões foi coletado 30 dias antes do início do experimento para divisão dos grupos por avaliação microscópica subjetiva do sêmen:

- Grupo I = Garanhões com motilidade total  $\leq 50\%$  (n=5) convencional/pré centrifugação
- Grupo II = Garanhões com motilidade total  $> 50\%$  (n=5) convencional/pré centrifugação

Cada garanhão dos grupos I e II foi coletado três (3) vezes com intervalo entre coletas de 5 dias (P1-P2-P3), totalizando 15 amostras por grupo

#### **Tratamento:**

Cada ejaculado (grupo I e grupo II) eram divididos em 2 tratamentos diferentes:

- CONVENCIONAL – foi utilizado protocolo convencional de congelação de sêmen.
- PRÉ-CENTRIFUGAÇÃO – foi realizado uma pré-centrifugação das amostras de sêmen previamente ao protocolo de congelação.

#### 3.2. Coleta e processamento do sêmen:

Foi coletado e processado simultaneamente o sêmen de um garanhão do Grupo I e um garanhão do Grupo II. Após a coleta, os ejaculados foram filtrados para descarte da fração gel. O volume foi mensurado em proveta graduada e uma alíquota separada para avaliação da motilidade espermática subjetiva.

O ejaculado foi acrescido com diluente comercial à base de leite desnatado (Botu-sêmen®), na proporção de 1:1. Após a diluição do sêmen as amostras foram divididas em dois tubos de centrifuga de 50 ml para o Grupo I e dois tubos de centrifuga de 50 ml para o Grupo II. As amostras foram pré-centrifugadas a 800g por 30 segundos (centrífuga de bancada Excelsa II, Modelo 206 Bl, Fanem®) e utilizando um cateter 14G e uma seringa de 5ml foi retirado o pellet de um tubo de cada grupo. E o outro tubo de cada grupo permaneceu com o “pellet”. Após isto, iniciou a centrifugação convencional de 600g por 10 minutos de acordo com técnica descrita por DELL`AQUA et al. (2001).

O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspendido e homogeneizado com o diluente (Botucurio®) para a concentração de  $150 \times 10^6$  espermatozóides por mililitro. As palhetas de 0,5 ml foram envazadas e separadamente identificadas com o nome do garanhão, número da partida e a denominação “PRE”, para as palhetas que foram envazadas com as amostras que foi retirado o “pellet” após a pre-centrifugação e com o nome do garanhão e número da partida para as palhetas que não foi retirado o “pellet” após a pre-centrifugação. Foram colocadas no refrigerador (Minitub®) e mantidas a temperatura de 5°C por 20 minutos. Após este período, as palhetas foram acondicionadas em caixa isotérmica com capacidade de 45 litros, previamente preenchida com nitrogênio líquido dispostas horizontalmente em uma plataforma de alumínio a 5,0 cm acima do nível do nitrogênio por 20 minutos. Após este período foram imersas diretamente no nitrogênio líquido de acordo com técnica descrita por PAPA et al., (2002).

### **3.3. Análises espermáticas:**

Após o armazenamento em botijões criobiológicos as amostras foram descongeladas a 37°C por 30 segundos, depositadas em microtubos graduados de 1,5 ml, acondicionadas em banho-maria seco a temperatura constante 37°C e avaliadas quanto a cinética espermática, integridade de membrana plasmática em microscopia de epifluorescência e peroxidação lipídica pela quantificação das substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS).

#### **3.3.1 Análise Computadorizada do Movimento Espermático (CASA)**

A qualidade do movimento espermático foi avaliada através do sistema ISAS® V.1.2 (Proiser, Valencia, Espanha). Os parâmetros avaliados corresponderam a motilidade

espermática total (MT, %) e progressiva (MP, %); velocidade de trajeto, curvilínea e progressiva (respectivamente VAP, VCL, VSL;  $\mu\text{m/s}$ ); linearidade (LIN,  $\mu\text{m/s}$ ) espermática; e porcentagem de espermatozoides exibindo movimento rápido (VR, %); deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ); frequência de batimento flagelar (BCF, Hz). Para cada amostra foram observados 5 campos aleatórios em câmara de análise modelo Sperm Tracker® (Proiser, Valencia, Espanha), avaliando-se um número mínimo de 200 células por campo.

### **3.3.2 Integridade de Membrana Plasmática (IMP)**

Para a determinação da integridade de membrana plasmática (IMP, %) utilizou-se a combinação de sondas fluorescentes Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídeo (PI), segundo metodologia descrita por Crespilho et al., (2014). Para tanto, houve a retirada uma alíquota de 25 $\mu\text{L}$  de sêmen de cada amostra, procedendo-se a pronta diluição em 25 $\mu\text{L}$  de solução de citrato de sódio 2,96% previamente aquecido a 37°C. À solução originada foi adicionado 50 $\mu\text{L}$  de solução de trabalho fluorescente, composta por 1,0 mL de citrato de sódio 2,94%, 20  $\mu\text{L}$  de formol salino tamponado (solução de 2mL de Formalina 38% em 98 mL de Ringer com Lactato de Sódio), 120  $\mu\text{L}$  de PI e 30  $\mu\text{L}$  de CFDA. As amostras coradas foram avaliadas sob lâmina e lamínula em aumento de 400 vezes através de microscopia de epifluorescência, permitindo a diferenciação das células portadoras de membrana plasmática íntegra (coloração verde devido a marcação pela carboxifluoresceína) ou lesada (exibindo coloração vermelha característica da sonda iodeto de propídeo, fluorocromo exclusivamente permeável às células portadoras de membrana plasmática desestruturada). Para cada amostra foram avaliadas 200 células espermáticas em cada um dos momentos experimentais.

### **3.3.3. Quantificação das substâncias reativas ao ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

Para a determinação do estresse oxidativo induzido (ou lipoperoxidação induzida) foi utilizada metodologia descrita por Duarte Jr et al., (2016) onde uma alíquota de 200 $\mu\text{L}$  de sêmen pós-descongelamento foi inicialmente lavada duas vezes para remoção dos resquícios de diluidor, acrescentando-se em seguida 1600 $\mu\text{L}$  de PBS. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 800g por 10 minutos, retirando-se 1600 $\mu\text{L}$  do sobrenadante pós a CE. À amostra recuperada (200  $\mu\text{L}$  compostos por pellet seminal e resquício de sobrenadante)

foram adicionados sulfato de ferro (50µL, 4 mM) e ascorbato de sódio (50µL, 20mM) para indução do estresse oxidativo. Em seguida cada amostra foi incubada por 90 minutos a 37°C em banho-maria. Após o período de incubação o estresse oxidativo foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro a 532nm utilizando curva previamente validada ( $56,838 + [19272 \times \text{absorbância}]$ ) para determinação das concentrações de MDA, expressas em ng TBARS/ $10^6$  espermatozóides.

#### **3.3.4. Avaliação Morfológica**

Para avaliação morfológica alíquotas de 100 µL de sêmen foram depositadas em frascos graduados de 1,5 ml contendo solução formol salino a 2% acrescida de 30 µL de solução de eosina a 1%. A partir da contagem de 200 células em microscopia de contraste de fase foram determinados os percentuais de defeitos espermáticos maiores (DM), defeitos menores (Dm) e totais (DT) de cada amostra de sêmen equino.

#### **3.3.5. Análise Estatística**

Os dados foram avaliados utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., 1999; Cary, EUA). Primeiramente, o teste de Shapiro-Wilk (Proc-Univariate) foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados, e o teste Qui-Quadrado (Proc-GLM) foi utilizado para testar a homogeneidade das variâncias. As médias dos grupos experimentais foram avaliadas usando análise de variância (Proc-GLM). Os resultados de TBARS, representativos dos níveis de peroxidação lipídica espontânea e induzida, foram log transformados e submetidos ao mesmo modelo de análise de variância. Proc-REG foram utilizados para calcular a relação entre a concentração de antioxidantes (independente do grupo experimental) para parâmetros cinéticos espermáticos e medidas de integridade da membrana. Significância foi definida como  $P \leq 0,05$ .



### **3.4. Resultados**

Foram coletados 3 ejaculados dos 10 garanhões (5 do grupo I e 5 do grupo II) totalizando 30 amostras.

Cada grupo (I e II) tiveram amostras congeladas de acordo com o protocolo convencional ou com a pré-centrifugação do sêmen.

#### **3.4.1. Análise computadorizada do movimento espermático**

Os resultados obtidos através da análise computadorizada do movimento espermático dos grupos I e II estão descritos nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos das análises realizadas, não houve diferença estatística significativa para nenhum dos parâmetros avaliados no grupo I, embora numericamente todos tenham apresentado resultados superiores quando houve a pré-centrifugação do sêmen (tabela -1)

Quanto à avaliação computadorizada do movimento espermático das amostras do grupo II, também não houve diferença estatística em nenhum dos 9 parâmetros avaliados e, nesse caso, observa-se que houve uma redução numérica em 7 parâmetros quando houve a centrifugação

#### **3.4.2. Quantificação das substâncias reativas do oxigênio**

Os resultados obtidos na quantificação das substâncias reativas do oxigênio das amostras descongeladas dos grupos I e II estão descritos nas tabelas 3 e 4.

Não houve diferença estatística entre as amostras processadas no protocolo convencional e das amostra pré-centrifugadas do grupo I, embora novamente, numericamente as amostras pré-centrifugadas tenham apresentado redução na concentração da malondialdeído, quando comparado às amostras processadas de forma convencional tanto no grupo I quanto no grupo II

#### **3.4.3. Avaliação morfológica e integridade de membrana espermática**

Os resultados obtidos na avaliação morfológica dos espermatozoides nos grupos I e II estão descritos na tabela-5.

Não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as amostras convencionais x pré-centrifugação dentro de cada grupo I e II.

Após serem feitas todas as análises espermáticas através da análise computadorizada do movimento espermático, integridade de membrana plasmática com as sondas fluorescentes, avaliação morfológica para patologias espermática, quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e análise estatística, os resultados estão mencionados nas tabelas a seguir.

**Tabela-1:** Médias  $\pm$  erro dos parâmetros avaliados na análise computadorizada do movimento no grupo I, das amostras congeladas no protocolo convencional e das amostras pré-centrifugadas.

<b>Parâmetros</b>	<b>Convencional</b>	<b>Pré-Centrifugação</b>	<b>P-Valor</b>
MT	23.40 $\pm$ 3.216	23.44 $\pm$ 3.315	0.9922
MP	5.286 $\pm$ 1.406	6.04 $\pm$ 1.66	0.7377
VCL	58.82 $\pm$ 4.00	59.26 $\pm$ 3.83	0.9354
VSL	25.226 $\pm$ 1.615	27.12 $\pm$ 1.81	0.4257
VAP	37.64 $\pm$ 2.285	38.606 $\pm$ 2.267	0.7477
LIN	43.28 $\pm$ 1.62	45.81 $\pm$ 1.62	0.3502
STR	66.97 $\pm$ 1.57	69.806 $\pm$ 1.89	0.2243
WOB	64.43 $\pm$ 1.34	65.473 $\pm$ 0.84	0.6159
ALH	2.78 $\pm$ 0.13	2.866 $\pm$ 0.094	0.6214
BCF	7.186 $\pm$ 0.519	8.08 $\pm$ 0.5405	0.1229
RAP	7.56 $\pm$ 2.19	7.09 $\pm$ 2.15	0.8940

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade progressiva, VAP: velocidade ao longo de uma trajetória média, LIN: linearidade, STR: retilinearidade, WOB: coeficiente de oscilação, ALH: deslocamento lateral de cabeça, BCF: frequência de batimento flagelar, RAP: espermatozóides rápidos.

**Tabela-2:** Médias  $\pm$  erro dos parâmetros avaliados na análise computadorizada do movimento no grupo II, das amostras congeladas no protocolo convencional e das amostras pré-centrifugadas.

<b>Parâmetros</b>	<b>Convencional</b>	<b>Pré-Centrifugação</b>	<b>P-Valor</b>
MT	46.12 $\pm$ 2.678	42.14 $\pm$ 2.145	0.3322
MP	18.46 $\pm$ 1.98	15.74 $\pm$ 1.159	0.2305
VCL	80.17 $\pm$ 4.02	78.646 $\pm$ 3.389	0.7785
VSL	38.68 $\pm$ 1.98	36.82 $\pm$ 1.14	0.4338
VAP	54.726 $\pm$ 2.37	52.19 $\pm$ 1.376	0.4005
LIN	48.866 $\pm$ 2.094	47.766 $\pm$ 2.195	0.6840
STR	70.473 $\pm$ 1.27	70.666 $\pm$ 1.72	0.9335
WOB	68.86 $\pm$ 1.79	67.13 $\pm$ 1.66	0.4059
ALH	2.95 $\pm$ 0.12	3.07 $\pm$ 0.1048	0.4594
BCF	8.926 $\pm$ 0.2349	8.91 $\pm$ 0.183	0.9814
RAP	27.29 $\pm$ 3.249	23.446 $\pm$ 2.239	0.2814

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade progressiva, VAP: velocidade ao longo de uma trajetória média, LIN: linearidade, STR: retilinearidade, WOB: coeficiente de oscilação, ALH: deslocamento lateral de cabeça, BCF: frequência de batimento flagelar, RAP: espermatozóides rápidos.

**Tabela-3:** Médias  $\pm$  da quantificação das substâncias reativas do oxigênio (TBARS) do grupo I, das amostras congeladas no protocolo convencional e das amostras pré-centrifugadas

<b>Parâmetros</b>	<b>Convencional</b>	<b>Pré-Centrifugação</b>	<b>P-Valor</b>
MDA	1015.78 $\pm$ 221.239	772.70 $\pm$ 102.266	0.3361
MDA CORRIGIDO	6.507 $\pm$ 1.7439	4.863 $\pm$ 0.7295	0.3164

MDA= concentração de Malondialdeído, um dos produtos da peroxidação de lipídeos da membrana do espermatozóide, para a concentração MDA corrigida pela concentração de MDA CORRIGIDO = concentração MDA corrigida pela concentração espermatozóides de cada dose.

**Tabela-4:** Médias  $\pm$  da quantificação das substâncias reativas do oxigênio (TBARS) do grupo II, das amostras congeladas no protocolo convencional e das amostras pré-centrifugadas

<b>Parâmetros</b>	<b>Convencional</b>	<b>Pré-Centrifugação</b>	<b>P-Valor</b>
MDA	1233.47 $\pm$ 238.217	816.16 $\pm$ 96.868	0.1014
MDA CORRIGIDO	5.75 $\pm$ 1.20	4.159 $\pm$ 0.5158	0.3322

MDA= concentração de Malondialdeído, um dos produtos da peroxidação de lipídeos da membrana do espermatozóide, para a concentração MDA corrigida pela concentração de MDA CORRIGIDO = concentração MDA corrigida pela concentração espermatozóides de cada dose.

**Tabela-5:** Medias  $\pm$  erro da integridade de membrana plasmática por sondas fluorescentes e da avaliação morfológica para defeitos espermáticos dos grupos I e II das amostras congeladas no protocolo convencional (CONV) e das amostras pré-centrifugadas (CENTRIF) antes do protocolo de congelamento.

Parâmetros	GRUPO I		GRUPO II		P-Valor
	CONV	CENTRIF	CONV	CENTRIF	
IMP	32.23 $\pm$ 2.76	34.00 $\pm$ 3.21	38.17 $\pm$ 2.72	37.20 $\pm$ 2.42	0.2630
DM	19.67 $\pm$ 1.675	22.07 $\pm$ 1.47	17.47 $\pm$ 2.28	17.53 $\pm$ 1.86	0.1575
Dm	8.60 $\pm$ 1.17	11.33 $\pm$ 4.34	4.13 $\pm$ 0.65	4.87 $\pm$ 0.89	0.0521
DT	28.30 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	29.20 $\pm$ 2.16 <sup>a</sup>	21.60 $\pm$ 2.18 <sup>b</sup>	22.20 $\pm$ 2.13 <sup>b</sup>	0.0074
DMCAB	3.07 $\pm$ 0.49	3.60 $\pm$ 0.59	2.93 $\pm$ 0.66	3.00 $\pm$ 0.51	0.7027
DCPI	14.53 $\pm$ 1.32 <sup>a</sup>	16.53 $\pm$ 1.41 <sup>a</sup>	10.60 $\pm$ 2.00 <sup>ab</sup>	10.00 $\pm$ 1.39 <sup>b</sup>	0.0051
GOTAS	4.93 $\pm$ 0.94	4.47 $\pm$ 1.05	5.60 $\pm$ 0.92	5.93 $\pm$ 1.07	0.5615

IMP: integridade de membrana plasmática, DM: defeitos maiores. Dm: defeitos menores, DT: defeitos totais, DMCAB: defeitos maiores de cabeça, DCPI: defeitos de cauda e peça intermediária, GOTAS: gotas distais e proximais

### **3.5. Discussão**

Com base nos achados de todos os parâmetros testados neste trabalho, a técnica da pré-centrifugação, não induziu defeitos morfológicos ou lesão da membrana plasmática. Entretanto, não apresentou resultados estatístico comparado com a metodologia convencional.



#### **4. POSSÍVEIS APLICABILIDADES DO PRODUTO**

A técnica demonstrou ser mais uma possibilidade a ser usada no campo sem trazer prejuízos em relação cinética espermática e estresse oxidativo. Inclusive, foi observada uma melhora para determinados ganhões quando analisado numericamente os resultados, sinalizando desta forma, um favorecimento deste novo protocolo para determinados indivíduos com baixa motilidade espermática.

## **5. CONCLUSÃO**

A técnica não demonstrou resultados estatístico em comparação com a técnica convencional.

Entretanto, houve um resultado numérico favorável em alguns indivíduos, acreditando-se que este protocolo possa favorecer determinados indivíduos e sinalizando a necessidade de realizar novos estudos com intuito de ampliar o número de amostragem com a metodologia utilizada.

## 6. REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J., KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p. 497-506, 2001.

ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., BURATINI JR, J. The effect of breeds spermatic parameters over equine semen freezability. **In: Symposium On Stallion Semen, Amersfoort. Proceedings...** p. 82, 1996.

ALVARENGA, M.A. Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões. 2003. **Tese** (Livredocência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ALVARENGA, M. A., PAPA, F. O., LANDIM-ALVARENGA, F. C., MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectans freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.

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

ARRUDA, R.P., BALL, B.A., GRAVANCE, C.G., LIU, I.K.M. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozóides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo, **Acta Scientiae Veterinariae**. 31 (Suppl.), 2003.

AURICH, J.E., SCHONHERR, U., HOPPE, H, AURICH, C. Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48,p.185-192, 1997

BALL BA, VO AT, BAUMBER J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **Am J Vet Res.** 2001;62:508-15.

BEDFORD, S. J.; GRAHAM, J. K.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Use of two freezing extenders to cool stallion spermatozoa to 5°C with and without seminal plasma. **Theriogenology**, v. 43 p. 939-953, 1995.

BRITO, L.F.C. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.249-264, 2007.

CRISPILHO, A. M., NICHI, M., GUASTI C., FREITAS C. P. , SÁ FILHO B., MAZIERO R. R., DELL'AQUA JR, J. A., PAPA F. O., Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. **Animal Reproduction Science** v.146, p. 126-133, 2014.

DELL'AQUA, J.A., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A., ZAHN, F.S. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v 68, p. 344–346, 2001

DUARTE JUNIOR, M. F., NICH, M. M., SILVA, L. E. S., TSUNEDA, P. P., ARGUELO, F. A. P. B., LOSANO, J. D. A. Utilização de Pentoxifilina e antioxidantes na criopreservação do sêmen bovino: Qualidade seminal e estresse oxidativo, v.32, n2, 110-116, 2016.

GIBB, Z., AITKEN, R. J. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage : The stallion as a Model. **BioMed Research International**, v. 2016, n, p. 8 , 2016

GOMES, G. M., JACOB, J. C. F., MEDEIROS, A. S. L, PAPA, F. O., ALVARENGA, M. A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative crioprotectants for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002<sup>a</sup>

GUERRA, M. M. P., EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p.187-195, 2004.

KATILA. T.; KARESKOSKI, M. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. **Pferdeheilkunde**, v. 22, p. 193-200, 2006.

MEDEIROS A. S. L.; GOMES, G. M.; CARMO, M. T. et al. Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade do sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores. 2007 **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 2007.

ORTEGA-FERRUSOLA, C., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L., MORRELL, J.M., SALAZAR-SANDOVAL, C., MACÍAS-GARCÍA, B., RODRÍGUEZMARTINEZ, H., TAPIA, J.A., PEÑA, F.J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v.138, p.55-63, 2009.

PAPA, F.O., ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JR, J.A., ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.184-187, 2002.

RICKER, J.V, LINFOR, J. J, DELFINO, W. J., KYSAR, P., SCHOLTZ, E. L, TABLIN, F, ET AL. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. **Biol Reprod.** v. 74, p. 62-65, 2006

SAMPER, J., MORRIS, C. A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**, v. 49, p. 895-903, 1998.

SQUIRES, E. L.; CROCKETT, E. C.; GRAHAM, J. K. et al. Effect of centrifugation and cooling prior to freezing on post-thaw motility of equine spermatozoa (on line). Colorado, 2000.

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

## 7. ANEXOS

### 7.1. ABREVIATURAS E SIGLAS

% = porcentagem

ROS = radicais oxidativos de oxigênio

CEUA = comissão de ética de uso de animais

$\leq$  = menor ou igual

$>$  = maior

P = partida

: = proporção

ml = mililitro

g = gravidade

$^{\circ}\text{C}$  = graus celsius

cm = centímetros

MT = motilidade total

MP = movimento progressivo

VAP = velocidade ao longo da trajetória

VCL = velocidade curvilínea

VSL = velocidade progressiva

LIN = linearidade

$\mu\text{m/s}$  = micrometro por segundo

ALH = deslocamento lateral da cabeça

BCF = frequência de batimento flagelar

RAP = espermatozóide rápido

$\mu\text{g}$  = microgramas

$\mu\text{M}$  = micromolar

IMP = integridade de membrana

CFDA = diacetato de carboxifluoresceína

PI = iodeto de propídeo

$\mu\text{L}$  = microlitro

Hz = hertz

mM = milimol

DM = defeitos maiores

Dm = defeitos menores

DT = Defeitos totais

MDA = concentração Malondialdeído

MDA CORRIGIDO = pela concentração de espermatozóide de cada dose

SAS = sistema de análise estatística

DMCAB = defeitos maiores de cabeça

DCPI: =defeitos de cauda e peça intermediária

PROC-GLM = análise de variância executada através de modelo linear geral