



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**JOÃO GABRIEL SILVEIRA BRAGA**

**EFEITOS DA FILTRAÇÃO OU CENTRIFUGAÇÃO EM  
ESPERMATOZOIDES DE ASININOS SUBMETIDOS À  
CRIOPRESERVAÇÃO EM DILUIDOR COMERCIAL BOTUCRIO®**

**JOÃO PESSOA  
2019**

**JOÃO GABRIEL SILVEIRA BRAGA**

**EFEITOS DA FILTRAÇÃO OU CENTRIFUGAÇÃO EM  
ESPERMATOZOIDES DE ASININOS SUBMETIDOS À  
CRIOPRESERVAÇÃO EM DILUIDOR COMERCIAL BOTUCRIO®**

Documento apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba como um dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**Orientadora:**

Profª. Drª Sildivane Valcácia Silva.

**Co-Orientadora:**

Camilla Flávia Avelino de Farias

**JOÃO PESSOA  
2019**

Catálogo na publicação  
Seção de Catalogação e Classificação

B813e BRAGA, Joao Gabriel Silveira.

Efeitos da filtração ou centrifugação em espermatozoides de asininos submetidos à criopreservação em diluidor comercial BotuCrio® / Joao Gabriel Silveira Braga. - João Pessoa, 2019.

50 f.

Orientação: Sildivane Valcácia Silva.

Coorientação: Camilla Flávia Avelino de Farias.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Criopreservação. 2. Sêmen. 3. Jumento. I. Silva, Sildivane Valcácia. II. Farias, Camilla Flávia Avelino de. III. Título.

UFPB/BC


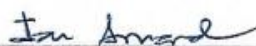
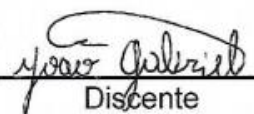
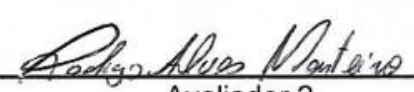


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)  
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB  
Coordenação do Curso de Bacharelado em  
Biotecnologia



### ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e quatro dias do mês de abril de 2019, às 16:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Sildivane Valcácia Silva e composta pelos avaliadores: 1. Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (DBCM/CBIOTEC/UFPB); 2. Med. Vet. Rodrigo Alves Monteiro (PPGCAn/CCA/UFPB), o discente João Gabriel Silveira Braga, matrícula 11505451, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Efeitos da filtração ou centrifugação em espermatozoides de asininos submetidos à criopreservação em diluidor comercial Botucurio®”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Sildivane Valcácia Silva, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pelo discente.

 <hr/> Presidente da Banca Examinadora	 <hr/> Avaliador 1
 <hr/> Discente	 <hr/> Avaliador 2

João Pessoa/PB, 24 de abril de 2019.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Verônica e José, e às minhas irmãs, Larissa, Laila e Layse, por me ensinarem os valores que carrego e inspirarem incentivo, criatividade e união familiar.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente e infinitamente à minha mãe, Verônica Rodrigues Silveira, responsável por eu estar onde estou, me ajudando de maneira incondicional (mesmo quando não estava de acordo) a enfrentar obstáculos que nem nós mesmos esperaríamos encontrar, mas que juntos, com muito amor e esforço conseguimos, mostrando os valores consistentes e dignos, a diferença entre o bem e o mal, e ensinando das maneiras mais caricatas a me preparar para o pior sempre esperando o melhor. Obrigado por me propiciar juntamente ao meu pai, José Braga de Lyra Filho, a oportunidade de morar em uma cidade diferente, a fim de realizar a vontade de cursar biotecnologia, tão almejado por mim desde a época da escola. Te amo mais que tudo nesse mundo.

Às minhas irmãs Larissa Banister, Laila Caroline e Layse Braga por sempre mostrarem interesse em meu crescimento intelectual e profissional, dando imenso suporte em todos os momentos emocionalmente e financeiramente instáveis da minha caminhada em uma vida nova. Em especial a Larissa, por sempre, desde que eu era um bebezinho, me encantar com a vocação do estudo e a arte do esclarecimento, incentivando a inventar e abusar da criatividade, buscar conhecimento e evitar a ignorância que cerca as conversas do dia a dia. Eu sinto muito sua falta!

À minha sobrinha Luiza Carolina, por todo o interesse em conhecer o titio como realmente gosta de ser e se divertir muito com isso, concordando ou não, tirando onda da cara do outro e ouvindo música cantando nosso próprio idioma, obrigado por ser luz em nossas vidas e manter viva a criança eterna dentro de mim.

À minha grande família pelo apoio, compreensão e incentivo em me tornar sempre alguém melhor. Aos meus tios Rubens e Teresa por me oferecerem o melhor lugar para encontrar paz, conforto familiar e comunicação com a natureza: o sítio Laranjeiras.

A José Victor Rodrigues pela amizade inestimável desde a infância, me oferecendo o melhor coração e os melhores ouvidos para lidar com meus maiores problemas e desabafos, independente da distância. Eu te amo muito!

A meus amigos que a vida acadêmica proporcionou, em mais que especial a Nicole Bezerra por todo amor, compreensão, esclarecimento, conversas, senso crítico, rolês, episódios assistidos de RuPaul's Drag Race, broncas e muito, muito amor, já disse isso? Sim e repito: Obrigado por todo amor! Ainda tão importantes, agradeço imensamente a Débora Lemos, Julyana Paula, Felipe Jordão, Beatriz Lopes, Rafael Dourado, Natanael Tavares, Bianca Teixeira, Sidney Júnior, Rayanelle Tissiane, Clara Maas, Mickael Sousa, Renata Lira,

Patrik Zarpellon, Matheus Fabião, Brenno Fernandes e Beatriz Calado pela amizade, carinho e apoio nas dificuldades, vocês foram o melhor porto seguro que a vida poderia me oferecer, e uma segunda família em João Pessoa.

À incrível orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sildivane Valcácia Silva, pelo enorme amor, gigantesco carinho e inacabável compreensão, sempre incentivando minha capacidade de ir além e dando broncas a favor de meu amadurecimento. Obrigado pelo aconchego e acolhimento no Laboratório e nas sabatinas. Eu te amo muito!

Aos meus amigos do ensino médio Ana Luísa Moscoso, Isaías Oliveira, Thaynara Lins, Thais Felex, Bruna Albuquerque e Camila Machado pelo imenso apoio e contato durante a jornada.

A todos os professores da Escola Virgem de Lourdes de Campina Grande e aos docentes do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, por inspirarem através do aprendizado e do ato de lecionar, a busca pelo conhecimento.

Para realização deste trabalho, agradeço:

À orientadora Sildivane Valcácia Silva, por me orientar da maneira mais confortável possível, sempre com muita paciência e compreensão.

À querida co-orientadora Camilla Flávia Avelino de Farias, pela gigantesca ajuda durante a parte experimental e pelos momentos de descontração e risadas. Muitíssimo obrigado, sem você isso não teria acontecido de maneira tão proveitosa.

Ao Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal do Cbiotec e seus integrantes, por auxílio e acompanhamento das atividades.

Ao ANDROLAB e sua equipe, em Recife, pela disponibilidade em nos receber e encaminhar boa parte dos experimentos.

*“We have calcium in our bones, iron in our veins, carbon in our souls, and nitrogen in our brains. 93 percent stardust, with souls made of flames, we are all just stars that have people names”*

*Nikita Gill*



## RESUMO

A criação de asininos exerce importante papel como fonte geradora de renda e empregos. A criopreservação de células gaméticas é uma das biotécnicas mais utilizadas para conservação do material genético. No presente estudo, objetivou-se avaliar os efeitos da centrifugação e da filtração como processos de retirada do plasma seminal em sêmen de asininos, utilizando o diluidor comercial BotuCrio®, amplamente utilizado para equinos. As amostras foram obtidas de dois reprodutores *Equus asinus* através da colheita do sêmen pelo método de vagina artificial. Após prévia avaliação, o sêmen foi dividido em duas frações equivalentes e adicionado o diluidor (Botusêmen) na proporção 1:1, posteriormente submetido a uma técnica de separação do plasma seminal: filtração ou centrifugação. Em seguida, as amostras foram individualmente ressuspensas em diluidor comercial de congelação (BotuCrio®). Foram formados oito grupos experimentais: AF0 (Grupo filtrado do animal A, avaliado no momento da descongelação); AF2 (Grupo filtrado do animal A, avaliado duas horas após descongelação); AC0 (Grupo centrifugado do animal A, avaliado no momento da descongelação); AC2 (Grupo centrifugado do animal A, avaliado duas horas após descongelação); BF0 (Grupo filtrado do animal B, avaliado no momento da descongelação); BF2 (Grupo filtrado do animal B, avaliado duas horas após descongelação); BC0 (Grupo centrifugado do animal B, avaliado no momento da descongelação); e BC2 (Grupo centrifugado do animal B, avaliado duas horas após descongelação). Após criopreservação, as células foram avaliadas no momento e duas horas pós-descongelação, sendo analisado: motilidade subjetiva; motilidade total, motilidade progressiva, parâmetros cinéticos quantitativos (velocidade curvilínea e velocidade progressiva) e qualitativos (amplitude de deslocamento lateral da cabeça, frequência de batimento flagelar e índice de hiperativação) pelo CASA; morfologia por câmara úmida; integridade de membrana por Eosina-Nigrosina e por epifluorescência com IP e DCF; funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico (HOST); e potencial mitocondrial e integridade acrossomal por epifluorescência. Para tratamento dos dados avaliou-se, inicialmente, a diferença entre os dois reprodutores através do teste t ( $p < 0,05$ ) e para os demais testes utilizou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Após identificação dos dados em distribuição paramétrica, as médias foram submetidas à análise de variância ANOVA, seguido pelo Teste Tukey ( $p < 0,05$ ). Observou-se uma redução na velocidade curvilínea, na integridade de membrana pelo método de eosina-nigrosina e no potencial mitocondrial apenas no grupo filtrado, entre os tempos zero e duas horas, enquanto no grupo centrifugado todos os parâmetros (com exceção da motilidade subjetiva) mantiveram-se estáveis, apontando tal técnica como a mais viável para criopreservação de sêmen asinino com diluidor BotuCrio®.

**Palavras-chave:** Criopreservação, BotuCrio®, plasma seminal, jumento.

## ABSTRACT

The donkey breeding plays an important role as source of income generation and employment. Cryopreservation of gametic cells is one of the most used biotechniques for conservation of genetic material. The aim of the current study was to evaluate the effects of centrifugation and filtration as seminal plasma withdrawal processes in asinine semen using the commercial diluent BotuCrio®, widely used in equines. The samples were obtained from two *Equus asinus* breeders through semen collect using the artificial vagina method. After a previous evaluation, the semen was separated in two equivalent fractions and the diluent (Botusêmen) was added in a 1: 1 ratio, subjected later to a seminal plasma separation technique: filtration or centrifugation. The samples were then resuspended in commercial frozen extender (BotuCrio®). Eight experimental groups were formed: AF0 (Animal A filtered group, evaluated at thawing time); AF2 (Animal A filtered group, evaluated two hours after thawing); AC0 (Animal A centrifuged group, evaluated at the thawing time); AC2 (Animal A centrifuged group, evaluated two hours after thawing); BF0 (Animal B filtered group, evaluated at thawing time); BF2 (Animal B filtered group, evaluated two hours after thawing); BC0 (Animal B centrifuged group, evaluated at the thawing time); and BC2 (Animal B centrifuged group, evaluated two hours after thawing). After cryopreservation process, cells were evaluated at the time and two hours after thawing for: subjective motility; total motility, progressive motility, quantitative (VCL and VSL) and qualitative (ALH, BCF and HI) kinetic parameters by CASA; sperm morphology by wet-chamber; membrane integrity by Eosin-Nigrosine and by epifluorescence with IP and DCF; membrane functionality by hyposmotic test (HOST); and mitochondrial potential and acrosomal integrity by epifluorescence. For the data treatment, the difference between the two breeders was initially evaluated through the t-test ( $p < 0.05$ ) and for the other tests the Shapiro-Wilk normality test was used. After data identification in parametric distribution, the average were submitted to variance analysis ANOVA, followed by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). A reduction in curvilinear velocity (VCL), in the membrane integrity by eosin-nigrosin (EN) and in mitochondrial potential was observed only in the filtered group, between zero and two hours, while in the centrifuged group all parameters (except subjective motility) remained satisfactory, pointing to this technique as the most viable for cryopreservation of asinine semen with BotuCrio® extender.

**Keywords:** Cryopreservation, BotuCrio®, seminal plasma, donkey.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Foto de asininos reprodutores.....	16
Figura 2:	Estrutura do espermatozoide.....	18
Figura 3:	Botijão de Nitrogênio líquido.....	25
Figura 4:	Sperm Class Analyzer (SCA/CASA).....	27
Figura 5:	Campo de avaliação da cinética espermática de asininos no CASA.....	27
Figura 6:	Anormalidades morfológicas da célula espermática.....	28
Figura 7:	Espermatozoides asininos vistos sob microscopia de epifluorescência e corados com IP e DEF.....	29
Figura 8:	Espermatozoides asininos observados por microscopia de epifluorescência e corados com JC-1.....	30
Figura 9:	Espermatozoides de asininos observados com microscopia de epifluorescência corados com FITC-PNA.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Percentual (média $\pm$ desvio padrão) de Motilidade Subjetiva de espermatozoides de asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos zero (T0) e duas horas (T2).....32
Tabela 2:	Percentual (média $\pm$ desvio padrão) de Motilidade Total e Motilidade Progressiva de espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos zero (T0) e duas horas (T2).....32
Tabela 3:	Números (média $\pm$ desvio padrão) de Velocidade Progressiva e Velocidade Curvilínea em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos zero (T0) e duas horas (T2).....33
Tabela 4:	Números (média $\pm$ desvio padrão) de Amplitude do Deslocamento Lateral e Frequência do Batimento Flagelar em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos zero (T0) e duas horas (T2).....33
Tabela 5:	Percentual (média $\pm$ desvio padrão) de Índice de Hiperativação em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos zero (T0) e duas horas (T2).....34
Tabela 6:	Percentual (média $\pm$ desvio padrão) de células sem e com anormalidades de espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação.....34
Tabela 7:	Percentual (média $\pm$ desvio padrão) de células com a membrana íntegra nos testes de dupla coloração com Eosina/Nigrosina e com IP e DCF em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos zero (T0) e duas horas (T2).....35
Tabela 8:	Percentual (média $\pm$ desvio padrão) de membrana funcional em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos zero (T0) e duas horas (T2).....35
Tabela 9:	Percentual (média $\pm$ desvio padrão) de potencial de membrana mitocondrial em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos zero (T0) e duas horas (T2).....36
Tabela 10:	Percentual (média $\pm$ desvio padrão) de acrossoma íntegro em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos zero (T0) e duas horas (T2).....36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
ATP	Adenosina trifosfato
BCF	Frequência de Batimento de Flagelo
CASA	Sistema computadorizado de avaliação espermática
DCF	Diacetato de Carboxifluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EN	Eosina/Nigrosina
FITC-PNA	Fluoresceína conjugada a <i>Peanut algalutinin</i>
IA	Inseminação artificial
iAC	Integridade de Acrossoma
IH	Índice de hiperativação
iMP	Integridade de Membrana Plasmática
IP	Iodeto de propídeo
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6' tetracloro-1,1,3,3' - tetraetilbenzilimidazolil
MP	Motilidade Progressiva
MT	Motilidade Total
PBS	Tampão fosfato salina
PMM	Potencial de Membrana Mitocondrial
ROS	Espécies Reativas ao Oxigênio
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade Progressiva

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1 EQUIDEOCULTURA .....	16
<b>2.1.1 Asininos</b> .....	<b>16</b>
2.2 BIOLOGIA ESPERMÁTICA .....	17
2.3 CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN ASININO .....	18
2.4 BIOTECNOLOGIA DO SÊMEN .....	19
<b>2.4.1 Efeitos da criopreservação</b> .....	<b>20</b>
2.5 UTILIZAÇÃO DO SÊMEN .....	20
<b>2.5.1 Crioprotetores</b> .....	<b>21</b>
<b>2.5.2 Processamento do sêmen</b> .....	<b>21</b>
2.5.2.1 <i>Centrifugação</i> .....	22
2.5.2.2 <i>Filtração</i> .....	22
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1 LOCAL E PERÍODO DO EXPERIMENTO .....	24
4.2 ANIMAIS E MANEJO .....	24
4.3 COLETA E PROCESSAMENTO DO SÊMEN .....	24
4.4 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN .....	25
4.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
4.6 ANÁLISE ESPERMÁTICA .....	26
<b>4.7.1 Parâmetros cinéticos</b> .....	<b>26</b>
<b>4.7.2 Morfologia</b> .....	<b>27</b>
<b>4.7.3 Teste de integridade da membrana plasmática</b> .....	<b>28</b>
<b>4.7.4 Teste de funcionalidade da membrana plasmática</b> .....	<b>29</b>
<b>4.7.5 Potencial da membrana mitocondrial</b> .....	<b>29</b>
<b>4.7.6 Integridade do acrossoma</b> .....	<b>30</b>
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
5.1 CINÉTICA ESPERMÁTICA .....	32
<b>5.1.1 Motilidade Subjetiva, Motilidade Total e Motilidade Progressiva</b> .....	<b>32</b>
<b>5.1.2 VSL e VCL</b> .....	<b>33</b>
<b>5.1.3 ALH e BCF</b> .....	<b>33</b>

<b>5.1.4 Índice de Hiperativação .....</b>	<b>33</b>
5.2 MORFOLOGIA .....	34
5.3 INTEGRIDADE DE MEMBRANA .....	34
5.4 FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA .....	35
5.5 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL .....	35
5.6 INTEGRIDADE DE ACROSSOMA.....	36
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>
<b>GLOSSÁRIO .....</b>	<b>50</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A criopreservação tornou-se uma das biotecnologias mais utilizadas para garantir a conservação do material genético, sendo amplamente utilizada no congelamento de células gaméticas, como os espermatozoides, principalmente de animais de criação que possuem importância sócio-econômica expressiva, como bovinos, ovinos, caprinos, suínos e equídeos. As células são submetidas a temperaturas extremamente baixas durante a congelação, a cerca de  $-196^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido, podendo apresentar diversas aplicações futuras em outras técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial e a transferência de embriões (SWANSON, 2002; BALDI et al., 2008; CANISSO, 2008).

Os animais apresentam características únicas no seu sêmen, que os diferem de outras espécies. Sendo assim, cada um deve apresentar um protocolo para correta criopreservação da célula espermática, devido às distintas composições do sêmen, a fim de minimizar o estresse em que as células são submetidas pela baixa temperatura, diferença de osmolaridade e limitação nutritiva. Durante todo esse processo pode ocorrer a formação de cristais de gelo e outras crioinjúrias que podem afetar a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática, bem como parâmetros cinéticos da motilidade espermática (WATSON, 2000; PURDY, 2006; MAIA 2009)

Os asininos são animais que têm grande importância na equideocultura brasileira, assim como na geração de empregos e na movimentação monetária nacional (CNA, 2016; ALVARENGA, 2010). Porém, as diversas espécies de jumentos não apresentam números expressivos de estudos ou exploração científica em relação aos equinos, inclusive no que cabe respeito ao conhecimento de seu sêmen e ao estudo de tecnologias reprodutivas eficientes associadas. Sendo assim, parte dos protocolos utilizados para criopreservação do sêmen de asininos são aproveitados da criopreservação dos espermatozoides de equinos (SWANSON; BROWN, 2004).

O diluidor comercial Botucurio® é bastante utilizado para criopreservação de sêmen de garanhões, apresentando bons efeitos no processo de congelação do material biológico de equinos, após retirada do plasma seminal (COSTA et al., 2014) Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos de duas formas de retirada do plasma seminal - centrifugação e filtração - na criopreservação de espermatozoides de asininos utilizando o diluidor comercial Botucurio®, visando otimizar a adaptação de um protocolo já existente.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 EQUIDEOCULTURA

O panorama mundial da indústria envolvendo equídeos apresenta importante papel como fonte geradora de renda e empregos, e no Brasil a equideocultura de destaca internacionalmente, tanto pelo rebanho expressivo, como pela excelência de seu plantel (ALVARENGA, 2010). O Brasil possui o terceiro maior rebanho mundial de equídeos, com cerca de 7,5 milhões de equinos e 1,2 milhões de muares e asininos, sendo este conjunto responsável pela geração de 664.220 empregos diretos e 3,2 milhões de empregos indiretos, correspondendo a uma movimentação financeira de 7,5 bilhões de reais por ano (CNA, 2006).

A equideocultura consiste na atividade humana de criação de animais equinos, asininos e muares. A potencialização do crescimento da equideocultura mundial é dada pela utilização de biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial e a criopreservação do sêmen (CANISSO et al., 2008).

#### 2.1.1 Asininos

O jumento doméstico (*Equus asinus*) representado na Figura 1 tem sua origem do mesmo tronco filogenético dos cavalos, segundo relatos de Torres e Jardim (1983), através de observações de fósseis antigos que foram descobertos na Ilha Pianosa, no Mar Adriático Meridional. Outros fósseis também foram encontrados na região da Argélia, quando foram denominados de *Equus asinus atlanticus* (RUMUSZKAN; JUNQUEIRA, 1980).

Figura 1. Foto de asininos reprodutores



Fonte: Rodrigo Alves Monteiro. Jumentos criados na cidade de Patos.

O jumento é considerado o quarto animal a ser domesticado pelo ser humano, com finalidade de produção, cerca de 6.000 anos atrás no Egito. Desde milênios atrás, os asininos apresentam determinado valor ao ser humano, denotado através de evidências arqueológicas de enterro do animal, o qual era utilizado para carregar materiais devido à sua resistência maior que a do cavalo, sendo também utilizado para produção de carne, leite e couro (MORAES, 2009).

O jumento doméstico é um membro da mesma família do cavalo, Equidae, da ordem Perissodactyla, que representa os mamíferos terrestres ungulados com um número ímpar de dedos nas patas, e sua nomenclatura atual só veio se diferenciar dos jumentos selvagens *Equus africanus* em 2003, pela Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica - ICZN (MENDES, 2016).

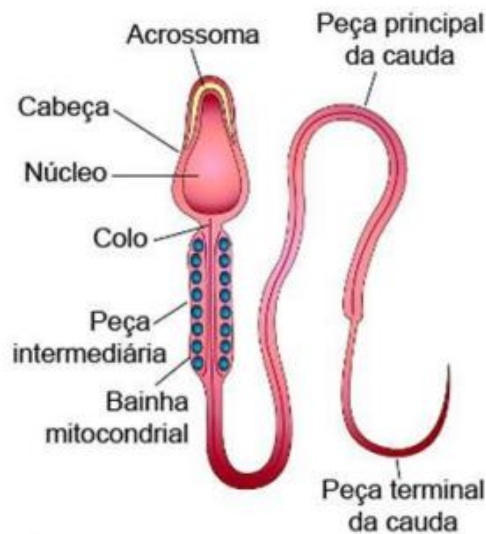
## 2.2 BIOLOGIA ESPERMÁTICA

Os espermatozoides são células produzidas pelos testículos através do processo de espermatogênese. Tais gametas são imóveis dentro das gônadas sexuais e incapazes de se ligar ao oócito, precisando passar por uma etapa de maturação que ocorre nos epidídimos e, após ejaculados no trato reprodutor da fêmea, pela capacitação (YANAGIMACHI, 1994).

Cada espécie animal apresenta uma organização estrutural do espermatozoide distinta, mas em mamíferos ele é constituído por duas partes principais: cabeça e cauda. A cabeça do espermatozoide contém o núcleo, formado por uma cromatina condensada e composto principalmente por DNA e proteínas (histonas), e o acrossoma, composto por uma dupla camada de membranas, localizado entre o núcleo e a membrana plasmática (Figura 2). A cauda, maior parte da célula, é dividida em peça intermediária, peça principal e peça final (GARNER, 1997; HAFEZ, 2004).

O espermatozoide é revestido externamente pela membrana plasmática, composta por bicamada lipídica, formada pelo conjunto de fosfolipídeos, glicolipídeos, colesterol e proteínas (ALBERTS et al., 2004) que podem ser classificadas como integrais ou periféricas (WATSON, 1981). Além disso, a membrana respeita a conformação de um “mosaico fluido”, externamente hidrofílica e internamente hidrofóbica, dificultando a passagem de água e moléculas (AMANN; PICKETT, 1987; DAVIES MOREL, 1999).

Figura 2. Estrutura do espermatozoide



Fonte: Moore et al., Embriologia Básica, 2013, p.11. O espermatozoide é dividido em cabeça, que contém o núcleo e acrossoma da célula, e cauda, dividida em peça intermediária, peça principal e peça terminal.

A peça intermediária é caracterizada pela presença da bainha mitocondrial, formada por mitocôndrias dispostas helicoidalmente (PESCH; BERGMANN, 2006), responsáveis pelo fornecimento de grande parte da energia para movimentação do espermatozoide através da produção de ATP (CAMARA; GUERRA, 2008).

A cabeça do espermatozoide de asinino é mais arredondada e maior que a do equino (NISHIKAWA, 1959; MANN et al., 1963). Há também uma maior ocorrência de inserção abaxial da peça intermediária se comparados aos espermatozoides de garanhões (EL WISHY, 1975). Porém, Launay (1990) relatou não haver diferenças na estrutura dos espermatozoides asininos da raça Poitou quando comparados aos espermatozoides equinos.

### 2.3 CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN ASININO

A composição e as características do sêmen variam de uma espécie para outra, e fatores anatômicos como tamanho do testículo, atividade reprodutiva e frequência de ejaculações podem influenciar no volume e na concentração espermática. Idade, condições climáticas e a nutrição animal também podem afetar parâmetros do sêmen (MAIA, 2009).

O sêmen apresenta, além dos espermatozoides, secreções dos órgãos acessórios do aparelho reprodutor masculino. A porção fluida dessa suspensão é o plasma seminal, o qual possui composição variada e importante para processos fisiológicos, como presença de

ocitocina e prostaglandinas para promoção da contração uterina (KATILA, 2001), substâncias moduladoras da resposta inflamatória uterina (TROEDSSON, 1999) e substâncias antioxidantes que minimizam a peroxidação lipídica (AMANN; GRAHAM, 1993).

## 2.4 BIOTECNOLOGIA DO SÊMEN

Tecnologias de reprodução assistida como a criopreservação de gametas, a inseminação artificial, a fertilização *in vitro* e a transferência de embriões estão sendo cada vez mais utilizadas (SWANSON, 2002; BALDI et al., 2008).

As biotecnologias de reprodução são grandes responsáveis pelo potencial crescimento da equideocultura mundial, e a inseminação artificial é a técnica de maior efeito na produção equídea. Além dela, a criopreservação do sêmen é outra biotecnologia de fundamental importância, porém as metodologias utilizadas no processo de congelamento do sêmen de asininos não diferem das que foram desenvolvidas para utilização em garanhões (CANISSO et al, 2008).

Apesar do sêmen asinino possuir várias características similares às dos equinos, cada espécie apresenta particularidades importantes (NISHIKAWA, 1959; HENRY et al., 1991), sendo necessário o entendimento das variações espécie-específicas existentes entre os animais para correto aproveitamento das tecnologias e desenvolvimento de protocolos efetivos (SWANSON; BROWN, 2004).

A criopreservação de gametas é fundamental para, dentre tantos objetivos, a criação de um banco de reserva genética, além de ser importante para a manutenção do potencial reprodutivo no futuro (MILLER et al., 1990), sendo uma ferramenta que oferece vantagens para preservação da viabilidade espermática por longos períodos (OSORIO, 2006). Porém, tal técnica para criopreservação de espermatozoides de mamíferos é um processo que necessita equilibrar uma série de fatores para obter resultados satisfatórios (PURDY, 2006).

O protocolo de criopreservação dessas células possui etapas consideradas prejudiciais à viabilidade espermática, como mudança de temperatura, diferença de pressão osmótica e a formação de cristais de gelo no meio extracelular (WATSON, 2000).

A viabilidade do processo de criopreservação é notada na conservação do material biológico por longo período, e a averiguação de seu sucesso pós-descongelado encontra-se na

posterior fertilização do oócito, que representa sua principal função após restabelecimento da temperatura (HOLT, 2000). Para que essa fertilização seja possível, o espermatozoide deve apresentar metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, enzimas acrossomais e proteínas sobre a membrana plasmática (AMANN; PICKETT, 1987).

#### **2.4.1 Efeitos da criopreservação**

A criopreservação espermática é um processo que acaba por provocar grande estresse celular nos espermatozoides (PURDY, 2006), como o choque térmico que promove um decréscimo irreversível na motilidade espermática, redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise, aumento da degeneração do DNA e liberação de material intracelular (WATSON, 2000). Além disso, pode ocorrer uma desidratação excessiva da célula, principalmente durante a congelação lenta, que fornece tempo o suficiente para saída da água do meio intra para o extracelular, e junto a essa desidratação fatores como elevada concentração de solutos, modificação no pH, e alteração no espermatozoide caracterizam o “efeito solução” (FAHY, 1980).

Durante o processo de criopreservação ocorrem mudanças na conformação da membrana plasmática, como o movimento de translocação de fosfolipídios e externalização da fosfatidilserina, e transformações ocorridas na membrana durante o processo de congelação/descongelação se assemelham às que ocorrem no processo de capacitação (SILVA et al., 2009). De acordo com Thomas et al. (2006), a criopreservação induz uma maior fluidez da membrana plasmática e exposição de sítios de ligação a moléculas externas, fazendo com que a célula tenha menor tempo para se capacitar.

A peroxidação lipídica ocorre através da interação de espécies reativas de oxigênio e os ácidos graxos poli-insaturados da membrana plasmática, indicando o estresse oxidativo celular (WILLIAMS; FORD, 2005).

## **2.5 UTILIZAÇÃO DO SÊMEN**

Os ejaculados da maioria dos animais domésticos apresentam uma concentração elevada de espermatozoides, mais elevada que o necessário para o processo de fecundação, sendo assim, para contribuir com o aproveitamento do ejaculado para um maior número de fêmeas, é realizada sua diluição (CASTELO et al., 2008). A interação entre os

espermatozoides e o meio diluidor representa um fator crucial para a preservação da integridade e habilidade de fecundação (MANJUNATH et al., 2002).

O sêmen pode ser refrigerado ou congelado. Quando é colhido, analisado e diluído com finalidade de proteger os espermatozoides durante a redução de temperatura a 5°C, o sêmen é refrigerado (BICUDO et al., 2003). Quando é colhido, analisado, conservado e estocado em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C, ele é congelado (CARNEIRO et al., 2007).

### **2.5.1 Crioprotetores**

Qualquer substância capaz de oferecer, temporariamente, proteção contra as crioinjúrias, energia e manutenção do ambiente favorável à sobrevivência celular é chamada de crioprotetor (PURDY, 2006). Os crioprotetores têm como principais objetivos evitar a formação de cristais de gelo intracelular, diminuir o estresse osmótico e funcionar como tampão para ajustes de potencial de Hidrogênio (MEDEIROS, 2002).

Crioprotetores são componentes do diluente de criopreservação e podem ser intra ou extracelulares. Os crioprotetores extracelulares ou não penetrantes são substâncias de alto peso molecular, como açúcares complexos, lipoproteínas da gema do ovo, água de coco, proteínas do leite e alguns aminoácidos, prevenindo a formação de cristais de gelo pela saída de água do meio intracelular (NUNES, 2002; AMANN e PICKETT, 1987). Os crioprotetores intracelulares ou penetrantes podem ser álcoois como glicerol, etilenoglicol e DMSO ou amidas como acetamida, lactamida, diometilformamida e dimetilacetilamida (FICKE et al., 2007; KASHIWAZAKI et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; CALDERAM et al., 2008).

A gema de ovo e o leite desnatado costumam ser utilizados como os agentes mais comuns contra as injúrias por choque térmico na criopreservação de espermatozoides de garanhões (BRAUN et al., 1995). A combinação no meio diluidor de gema de ovo com o glicerol é o protocolo utilizado para realização da maioria dos diluidores comerciais como o BotuCrio® (ÁLVAREZ, 2019).

### **2.5.2 Processamento do sêmen**

Apesar de sua reconhecida importância, os protocolos de criopreservação e resfriamento de sêmen preconizam a retirada do plasma seminal, julgando-a como necessária para sobrevivência dos espermatozoides criopreservados (AMANN e PICKETT, 1987).

Normalmente essa remoção é realizada por centrifugação, porém estudos mostram que essa técnica pode causar danos mecânicos nos espermatozoides (KARESKOSKI et al., 2006; ALVARENGA et al., 2010). Outros estudos apontam a filtragem por Sperm Filter como sendo outra forma viável de retirada do plasma seminal (ALVARENGA et al., 2010)

#### *2.5.2.1 Centrifugação*

A centrifugação é uma técnica geralmente utilizada para concentrar espermatozoides do ejaculado e remover o plasma seminal para minimizar seus efeitos deletérios sobre a qualidade seminal (ALVARENGA et al., 2010; RAMIRES NETO et al., 2013; SIEME et al., 2015).

O objetivo da centrifugação é atingir uma elevada taxa de recuperação de espermatozoides, com o mínimo possível de danos celulares (MACPHERSON et al., 2001). Fatores como intensidade e tempo de centrifugação influenciam positivamente, caso adequados, na maior recuperação de células espermáticas e mínimos danos estruturais e funcionais aos espermatozoides, obtendo bons índices de congelabilidade do sêmen (HEITLAND et al., 1996).

Mesmo a centrifugação não exercendo efeito sobre a morfologia dos espermatozoides (VIDAMENT et al., 2001), ela deve ser efetuada com muito cuidado, pois diversos estudos científicos já relataram que esta técnica pode causar injúrias aos espermatozoides, reduzindo sua motilidade e fertilidade (SHARMA et al., 1997; AURICH, 2008, KARESKOSKI et al., 2006; SIEME et al., 2003).

#### *2.5.2.2 Filtração*

Outro método de separação do plasma seminal e que também é de fácil aplicabilidade foi proposto por Alvarenga et al. (2010): a filtragem do sêmen. Para realização da filtragem é utilizado o dispositivo Sperm Filter® (Ceafepe Tecnologia Veterinária Ind., Sorocaba, São Paulo, Brasil), que retém apenas os espermatozoides através da passagem do plasma seminal.

O filtro retém os espermatozoides eficazmente, não causando danos à motilidade e viabilidade espermática, podendo ser considerada uma técnica potencialmente útil para: animais que apresentam sêmen de baixa qualidade e precisam passar por separação dos espermatozoides do plasma e/ou diluidor; concentração espermática para refrigeração; criopreservação e produção de doses para IA (ALVARENGA et al., 2010).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da filtração e da centrifugação nos parâmetros espermáticos para o sêmen de asininos após criopreservação com diluidor comercial Botucrio®.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o efeito do diluidor BotuCrio® na criopreservação de sêmen asinino.

Comparar a eficiência entre os métodos de centrifugação e filtração.

Mensurar o efeito da filtração ou da centrifugação sobre os parâmetros de motilidade, integridade e funcionalidade da membrana, potencial de membrana mitocondrial, morfologia e integridade do acrossoma, zero e duas horas pós-descongelamento.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL E PERÍODO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado em três etapas: inicialmente, foi realizada a colheita do sêmen de jumentos, diluição e criopreservação das amostras na Universidade Federal de Campina Grande, cidade de Patos, Paraíba; depois, realizou-se parte das análises no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, em João Pessoa (PB); e as demais análises ocorreram no ANDROLAB do departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Recife (PE), durante o primeiro trimestre de 2019. Este estudo foi previamente autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB, sob protocolo N° 7312180618.

### 4.2 ANIMAIS E MANEJO

Foram utilizados dois machos reprodutores asininos da espécie *Equus asinus*, com 15 e 6 anos de idade, peso médio de 125 kg e com histórico de fertilidade. Tais animais foram criados na cidade de Patos (PB; 07° 01' 28" S 37° 16' 48" O) e alimentados com feno de *Brachiaria decumbens* e ração composta por farelo de trigo e milho, acrescido de sais minerais.

### 4.3 COLETA E PROCESSAMENTO DO SÊMEN

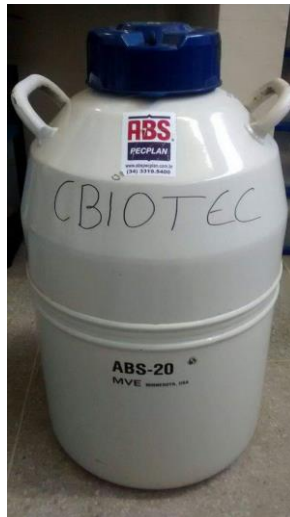
Os ejaculados foram obtidos através do método de vagina artificial, colhidos em três dias consecutivos após correta higienização do aparelho reprodutor dos machos. O sêmen, após prévia avaliação (CBRA, 2013), foi dividido em duas frações equivalentes e adicionado o diluidor (Botusêmen, Botucatu, São Paulo), na proporção de 1:1, e submetido às técnicas de separação do plasma seminal, por método de centrifugação (2000 rpm, 10 minutos) e filtração por membrana (Sperm Filter, Botupharma, São Paulo).

Em seguida, cada amostra foi ressuspensa em diluidor comercial de congelação (Botucurio®, Botucatu, São Paulo), na concentração final de 200 milhões de espermatozoides por palheta, sendo esta de 0,5 mL.

#### 4.4 CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN

As amostras de sêmen previamente diluídas foram criopreservadas por método automatizado (TK-3000 SE; curva P2S2), iniciada com a curva de refrigeração (0,25°C/min), e posterior curva de congelação (10 °C/min), com duas horas de tempo de estabilização. Após o término da congelação em máquina, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido (-196°C), onde ficaram armazenadas por semanas até que as amostras fossem avaliadas microscopicamente em laboratório (Figura 3).

Figura 3. Botijão de Nitrogênio líquido



Fonte: Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal, UFPB. O nitrogênio líquido é utilizado como principal meio para criopreservação, atingindo temperaturas de -196 °C.

#### 4.5 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram separadas amostras de dois animais (A) e (B), cada um tendo seu plasma seminal retirado por meio de centrifugação (C) ou filtração (F) por membrana e foram avaliados os parâmetros em dois tempos: logo após a descongelação (T 0h) e duas horas depois (T 2h), chamado teste de termo resistência. Portanto, os grupos foram avaliados em três repetições, em duplicata, sendo eles:

- ✓ AF0 – Grupo filtrado do animal A, avaliado no momento da descongelação (zero hora);
- ✓ AF2 – Grupo filtrado do animal A, avaliado duas horas após descongelação;
- ✓ AC0 – Grupo centrifugado do animal A, avaliado no momento da descongelação;
- ✓ AC2 – Grupo centrifugado do animal A, avaliado duas horas após descongelação.
- ✓ BF0 – Grupo filtrado do animal B, avaliado no momento da descongelação (zero hora);
- ✓ BF2 – Grupo filtrado do animal B, avaliado duas horas após descongelação;
- ✓ BC0 – Grupo centrifugado do animal B, avaliado no momento da descongelação;
- ✓ BC2 – Grupo centrifugado do animal B, avaliado duas horas após descongelação.

#### 4.6 ANÁLISE ESPERMÁTICA

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, e submetidas às avaliações de motilidade, além de testes da integridade e funcionalidade da membrana plasmática, bem como morfologia, potencial de membrana mitocondrial e integridade acrossomal.

##### 4.7.1 Parâmetros cinéticos

Parte das amostras foram analisadas de forma subjetiva por dois avaliadores em microscópio de contraste de fase, através da colocação de 10 µL da amostra pós-descongelada em lâmina e posterior deposição de lamínula sobre a gota para avaliação de motilidade. Outra parte das amostras foi submetida ao CASA (Sperm Class Analyzer, SCA™, Microoptics, S.L., Version 3.2.0, Barcelona, Espanha), representado na figura 4, para análise de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Velocidade Progressiva (VSL), Velocidade Curvilínea (VCL), Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH), frequência de batimento do flagelo (BCF) e índice de hiperativação (IH), todos de forma objetiva.

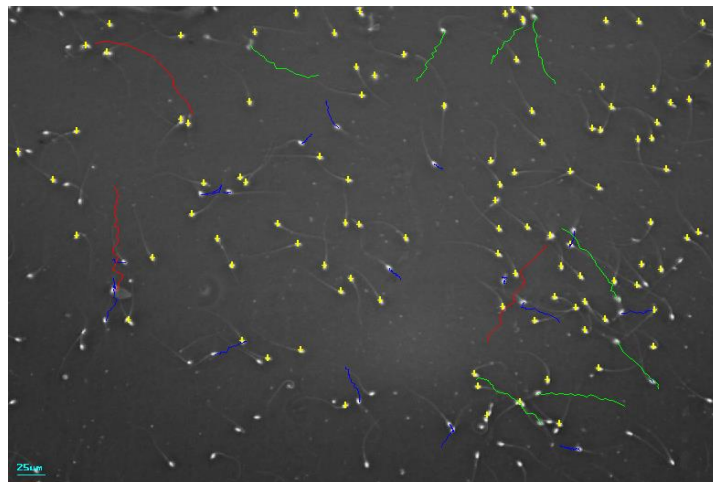
Uma alíquota de 10 µL de cada amostra foi posicionada em lâmina coberta por lamínula, na temperatura e observada em microscópio de contraste de fase com aumento de 100x (Nikon™ H5505, Eclipse 50i, Tóquio, Japão), no qual foram capturadas imagens (Figura 5) a partir de câmera de vídeo (Basler Vision Technologie™ A312FC, Ahrensburg, Alemanha). Para cada amostra foram analisados cinco campos aleatórios, com registro de, no mínimo, 2.000 espermatozoides.

Figura 4. Sperm Class Analyzer (SCA™/CASA)



Fonte: Laboratório de Andrologia, UFRPE. Cedido por Camilla Flávia Avelino de Farias.

Figura 5. Campo de avaliação da cinética espermática de asininos no CASA



Fonte: autor. A imagem acima mostra a captura de uma área da amostra, e as linhas coloridas representam a trajetória dos espermatozoides em um determinado tempo. As marcações em amarelo indicam células imóveis/mortas, marcações em azul espermatozoides lentos, em verde espermatozoides de velocidade média e em vermelho indicam células com cinética progressiva rápida.

#### 4.7.2 Morfologia

Para análise da morfologia espermática, utilizou-se o método de câmara úmida (CBRA, 2013). Cada amostra é diluída em solução formol-salina na proporção 1:10. São contados 200 espermatozoides em microscópio ótico com aumento de 40x, considerando a proporção entre os normais ou com anormalidades, que podem ser observadas ao longo da célula, seja na cabeça, peça intermediária ou cauda (Figura 6), este último necessário para diminuir as alterações presentes, que são encontradas no teste de funcionalidade da membrana (MELO et al., 2005).

Figura 6. Anormalidades morfológicas da célula espermática



Fonte: <http://androfert.com.br/img/Image/Morfologia%20Espermatoz%C3%B3ides.jpg> Anormalidades na célula espermática podem ser encontradas ao longo de toda estrutura celular, mas são divididos majoritariamente em defeitos de cabeça, defeitos de peça intermediária e defeitos de cauda.

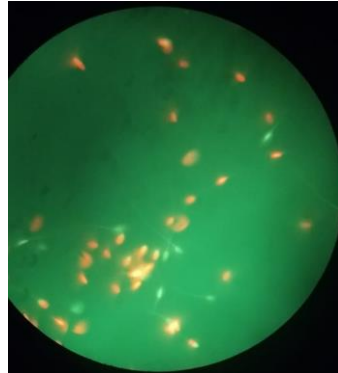
#### 4.7.3 Teste de integridade da membrana plasmática

Tal teste foi realizado de duas formas: a primeira com o método de coloração dupla com iodeto de Propídeo (IP) e Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF); e a segunda através da coloração dupla com Eosina-Nigrosina (CBRA, 2013).

Na dupla coloração com IP e DCF, alíquotas de 10  $\mu$ L de sêmen foram diluídas em 30  $\mu$ L de PBS, e adicionados 5  $\mu$ L de IP e 5  $\mu$ L de DCF. Amostras de 10  $\mu$ L foram examinadas em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com aumento de 40x, usando filtro de emissão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485-520 nm, e contados 200 espermatozoides, classificando-os como membrana íntegra quando corado em verde ou como membrana danificada, quando corado em vermelho (Figura 7).

No método de coloração com Eosina-Nigrosina foram diluídos 25  $\mu$ L de sêmen de cada grupo experimental, 25  $\mu$ L do corante e 50  $\mu$ L de solução fisiológica (0,9% NaCl). Após a diluição é realizado o estiramento com 10  $\mu$ L de cada amostra e contadas 200 células no microscópio óptico com aumento de 40x, nas quais as coradas representam os espermatozoides com membrana rompida, e as não coradas com membrana íntegra.

Figura 7. Espermatozoides asininos descongelados corados com sondas fluorescentes – iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína – e avaliados por microscopia de epifluorescência.



Fonte: autor. Espermatozoides que emitem fluorescência verde apresentam membrana íntegra, enquanto os vermelhos indicam espermatozoides com a membrana plasmática lesada.

#### 4.7.4 Teste de funcionalidade da membrana plasmática

O teste hiposmótico (HOST) tem como objetivo avaliar se a membrana celular do espermatozoide está funcional, e para isso se baseia nas características e propriedades de manutenção do equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular, de modo que, ao submeter a célula à solução HOST, ela enrole sua cauda como resposta, implicando em uma membrana funcional.

Diluiu-se 10  $\mu\text{L}$  de cada grupo experimental em 100  $\mu\text{L}$  de solução hiposmótica, submetendo posteriormente a solução ao banho-maria (37  $^{\circ}\text{C}$ ) por 30 min, e depois desse tempo colocou-se 50  $\mu\text{L}$  de solução formol citrato. Foi retirado 10  $\mu\text{L}$  da suspensão final e colocada em lâmina, sobreposta por lamínula na gota, e contados 200 espermatozoides em microscópio ótico com aumento de 40x, ditando a proporção entre os que enrolaram a cauda ou não (FAGUNDES et al., 2010).

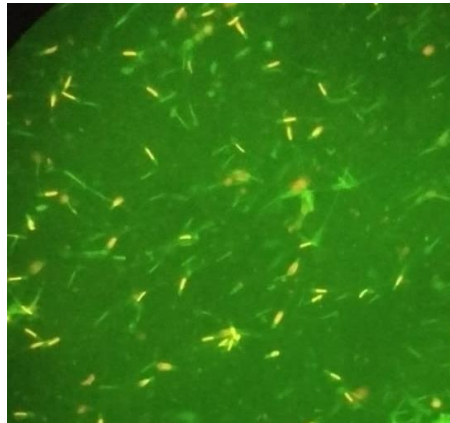
#### 4.7.5 Potencial da membrana mitocondrial

O potencial mitocondrial dos espermatozoides foi determinado pela utilização do fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE; WELCH, 2006). Foram diluídos 10  $\mu\text{L}$  de sêmen em 30  $\mu\text{L}$  de solução PBS, e adicionado 5  $\mu\text{L}$  de Iodeto de 5,5',6,6' tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzilimidazolil (JC-1).

Foram avaliados 200 espermatozoides de cada amostra em microscópio de epifluorescência, com aumento de 100x sob óleo de imersão, utilizando filtro de emissão LP

515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Foram observadas células com a peça intermediária corada em laranja, equivalente a um alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto as que estavam em verde foram classificadas com baixo ou nulo potencial de mitocôndria (Figura 8).

Figura 8. Espermatozoides asininos criopreservados corados com JC-1 e avaliados por microscopia de epifluorescência.



Fonte: Autor. Os espermatozoides visualizados com a coloração verde apresentam baixo potencial de membrana mitocondrial, enquanto os fluorescentes em laranja apresentam alto potencial mitocondrial.

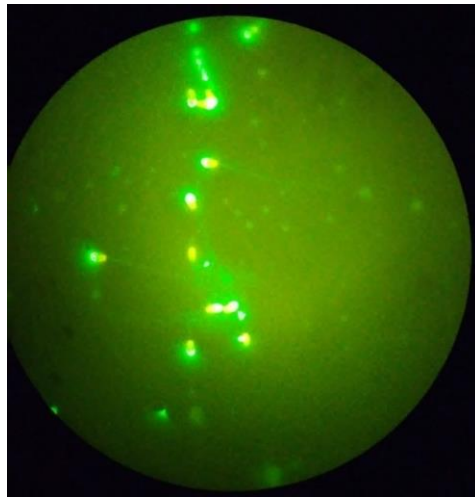
#### 4.7.6 Integridade do acrossoma

Para determinar a integridade acrossomal, as células espermáticas foram coradas com Isotiocianato de Fluoresceína conjugado a aglutinina do amendoim (FITC-PNA), descrito anteriormente por Roth et al. (1998). Aliquotas de 10  $\mu\text{L}$  da amostra foram preparadas para estiragem e secadas ao ar. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  da solução estoque de FITC-PNA (1 mg/mL) foi descongelada e adicionada a 900  $\mu\text{L}$  de solução PBS para obter a concentração final de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Aliquotas de 30  $\mu\text{L}$  desta solução foram sobrepostas nas lâminas, que foram incubadas em câmara úmida à 4 °C e na ausência de luz, por 15 minutos. Após incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS refrigerado a 4 °C e colocadas para secar, novamente, em ausência de luz.

Para posterior avaliação, 5  $\mu\text{L}$  de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre a lâmina sobreposta posteriormente de lamínula. Avaliaram-se 200 espermatozoides em microscopia de epifluorescência em aumento de 100x sob óleo de imersão, utilizando o filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação.

Os espermatozoides foram classificados como portadores de acrossomas intactos quando apresentavam a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou como acrossomas reagidos, quando apresentavam faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda cabeça da célula (Figura 9).

Figura 9. Espermatozoides de asininos criopreservado corados com FITC-PNA e submetidos à microscopia de epifluorescência.



Fonte: Autor. Maior intensidade de fluorescência pode ser observada nos espermatozoides que apresentam integridade acrossomal.

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação de diferença entre os reprodutores, utilizou-se o teste t, com nível de significância de 5%. Para os demais testes utilizou-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk, e após identificação dos dados em distribuição paramétrica, as médias foram submetidas à análise de variância ANOVA, seguido de Teste Tukey, com nível de significância de 5%.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 CINÉTICA ESPERMÁTICA

Após verificar que não houve diferença estatística entre os reprodutores A e B, foi formado um grupo filtrado e um centrifugado (ambos com amostras tanto do animal A quanto do B), mantendo-se o tempo de avaliação pós-descongelamento (T0 e T2 horas).

#### 5.1.1 Motilidade Subjetiva, Motilidade Total e Motilidade Progressiva

Para o parâmetro motilidade subjetiva foi observada que tanto o sêmen filtrado como o centrifugado apresentaram uma queda significativa ( $p < 0,05$ ) após duas horas de descongelamento (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual (média  $\pm$  desvio padrão) de motilidade subjetiva de espermatozoides de asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos 0h e 2h

Grupos	Motilidade Subjetiva (%)	
	T0	T2
GF	67,9 $\pm$ 10,1 <sup>A</sup>	25,3 $\pm$ 9 <sup>B</sup>
GC	64,2 $\pm$ 12,9 <sup>A</sup>	17,3 $\pm$ 9,7 <sup>B</sup>

GF= Grupo Filtrado; GC= Grupo Centrifugado; T0= zero hora pós-descongelamento; T2= duas horas pós-descongelamento. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença entre os tempos de avaliação.

Não houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre os tempos zero e duas horas dos grupos filtrado e centrifugado (Tabela 2) para os parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva obtidos através do CASA.

Tabela 2. Percentual (média  $\pm$  desvio padrão) de motilidade total e progressiva de espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos 0h e 2h

Grupos	Motilidade Total (%)		Motilidade Progressiva (%)	
	T0	T2	T0	T2
GF	55,3 $\pm$ 6,6	28,9 $\pm$ 26,0	17,5 $\pm$ 5,9	7,4 $\pm$ 6,9
GC	52,3 $\pm$ 19	47,2 $\pm$ 12,1	19,7 $\pm$ 10,0	15,6 $\pm$ 3,1

GF= Grupo Filtrado; GC= Grupo Centrifugado; T0= zero hora pós-descongelamento; T2= duas horas pós-descongelamento.

### 5.1.2 VSL e VCL

Para os parâmetros cinéticos de Velocidade Progressiva (VSL) e Velocidade Curvilínea (VCL), observou-se diferença ( $P < 0,05$ ) na VCL, para o grupo filtrado, mostrando uma redução em  $\mu\text{m/s}$  do tempo 0h para o tempo 2h (Tabela 3).

Tabela 3. Números (média  $\pm$  desvio padrão) de Velocidades Progressiva e Curvilínea em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos 0h e 2h.

Grupos	Velocidade Progressiva ( $\mu\text{m/s}$ )		Velocidade Curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ )	
	T0	T2	T0	T2
<b>GF</b>	33,8 $\pm$ 4,4	23,9 $\pm$ 6,0	51,0 $\pm$ 4,8 <sup>A</sup>	37,4 $\pm$ 4,9 <sup>B</sup>
<b>GC</b>	35,9 $\pm$ 6,1	30,5 $\pm$ 5,8	50,1 $\pm$ 0,1	44,3 $\pm$ 4,8

GF= Grupo Filtrado; GC= Grupo Centrifugado; T0= zero hora pós-descongelamento; T2= duas horas pós-descongelamento. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os tempos de avaliação.

### 5.1.3 ALH e BCF

Para os parâmetros de Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH) e Frequência do Batimento Flagelar (BCF), não foi verificada nenhuma diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tempos dos grupos filtrado ou centrifugado (Tabela 4).

Tabela 4. Valores (média  $\pm$  desvio padrão) de ALH e BCF em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos 0h e 2h

Grupos	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça ( $\mu\text{m}$ )		Frequência do Batimento Flagelar (Hz)	
	T0	T2	T0	T2
<b>GF</b>	2,6 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 0,3	8,9 $\pm$ 0,4	8,3 $\pm$ 0,5
<b>GC</b>	2,1 $\pm$ 0,0	2,3 $\pm$ 5,8	8,5 $\pm$ 0,1	9 $\pm$ 1,1

ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide; BCF: batimento cruzado flagelar. GF= Grupo Filtrado; GC= Grupo Centrifugado; T0= zero hora pós-descongelamento; T2= duas horas pós-descongelamento.

### 5.1.4 Índice de Hiperativação

Para o parâmetro de Índice de Hiperativação (IH) não foi observada nenhuma diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tempos nos grupos filtrado ou centrifugado (Tabela 5).

Tabela 5. Percentual (média  $\pm$  desvio padrão) de Índice de Hiperativação em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos 0h e 2h pós-descongelamento

Grupos	Índice de Hiperativação (%)	
	T0	T2
GF	1,6 $\pm$ 0,9	1,4 $\pm$ 1,1
GC	1,2 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,8

GF= Grupo Filtrado; GC= Grupo Centrifugado; T0= zero hora pós-descongelamento; T2= duas horas pós-descongelamento.

## 5.2 MORFOLOGIA

Para parâmetro de morfologia estabeleceu-se uma proporção entre espermatozoides normais e com anormalidades representada na Tabela 6. Foram visualizados, além dos espermatozoides considerados normais, aqueles com defeitos de: cabeça, como macrocefalia ou cabeça dupla; peça intermediária, como inserção anômala ou gota citoplasmática distal; e cauda, como cauda curta, dobrada ou enrolada.

Tabela 6. Percentual (média  $\pm$  desvio padrão) de espermatozoides asininos com e sem anormalidades após métodos de separação do plasma seminal por filtração ou centrifugação e criopreservação

Grupos	Células sem anormalidades (%)	Células com anormalidades (%)
GF	78,33 $\pm$ 8,31	21,67 $\pm$ 8,31
GC	77,25 $\pm$ 9,51	22,75 $\pm$ 9,51

GF = Grupo Filtrado; GC = Grupo Centrifugado. Células com anormalidades podem incluir defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda.

## 5.3 INTEGRIDADE DE MEMBRANA

No teste de integridade da membrana plasmática realizado a partir da dupla coloração com Eosina/Nigrosina foi observado que houve diminuição ( $p < 0,05$ ) na proporção de células consideradas íntegras no grupo GF (Tabela 7). Enquanto na dupla coloração com Iodeto de Propídeo (IP) e Diacetato de carboxifluoresceína (DCF) não foram encontradas diferenças entre os tempos dos grupos.

Tabela 7. Percentual (média  $\pm$  desvio padrão) de células com a membrana plasmática íntegra nos testes de EN e com IP e DCF em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos 0h e 2h pós-descongelamento

Grupos	Integridade de Membrana EN (%)		Integridade de Membrana IP/DCF (%)	
	T0	T2	T0	T2
GF	81,7 $\pm$ 4,0 <sup>A</sup>	71,8 $\pm$ 11,3 <sup>B</sup>	30,7 $\pm$ 7,0	31,4 $\pm$ 6,0
GC	75,3 $\pm$ 6,6	68,9 $\pm$ 5,0	44,3 $\pm$ 27,3	37,1 $\pm$ 3,6

EN = Eosina/Nigrosina; IP/DCF = Iodeto de Propídeo/Diacetato de Carboxifluoresceína; GF= Grupo Filtrado; GC= Grupo Centrifugado; T0= zero hora pós-descongelamento; T2= duas horas pós-descongelamento. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os tempos de avaliação.

#### 5.4 FUNCIONALIDADE DA MEMBRANA

Para o parâmetro de Funcionalidade da Membrana Plasmática (Tabela 8) não houve diferença ( $p < 0,05$ ) entre os tempos dos grupos GF e GC.

Tabela 8. Percentual (média  $\pm$  desvio padrão) de membrana plasmática funcional em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos 0h e 2h pós-descongelamento

Grupos	Funcionalidade de Membrana Plasmática (%)	
	T0	T2
GF	20,7 $\pm$ 10,3	12,5 $\pm$ 5,7
GC	21,2 $\pm$ 16,1	13,5 $\pm$ 6,2

GF= Grupo Filtrado; GC= Grupo Centrifugado; T0= zero hora pós-descongelamento; T2= duas horas pós-descongelamento.

#### 5.5 POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL

No teste para Potencial de Membrana Mitocondrial (Tabela 9), houve redução ( $p < 0,05$ ) no número de espermatozoides com alto potencial mitocondrial entre os tempos apenas no grupo filtrado (GF).

Tabela 9. Percentual (média  $\pm$  desvio padrão) de potencial de membrana mitocondrial em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos 0h e 2h pós-descongelamento

Grupos	Potencial de Membrana Mitocondrial (%)	
	T0	T2
GF	52,7 $\pm$ 17,8 <sup>A</sup>	33,7 $\pm$ 5,5 <sup>B</sup>
GC	41,0 $\pm$ 12,4	39,8 $\pm$ 7,6

GF= Grupo Filtrado; GC= Grupo Centrifugado; T0= zero hora pós-descongelamento; T2= duas horas pós-descongelamento. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os tempos de avaliação. Letras minúsculas entre as colunas indicam diferença entre os grupos.

## 5.6 INTEGRIDADE DE ACROSSOMA

Para o parâmetro Integridade de Acrossoma (Tabela 10), observou-se uma diferença significativa entre os grupos centrifugado e filtrado após duas horas de descongelamento (T2).

Tabela 10. Percentual (média  $\pm$  desvio padrão) de acrossoma íntegro em espermatozoides asininos criopreservados pós-filtração ou centrifugação nos tempos 0h e 2h pós-descongelamento

Grupos	Integridade Acrossomal (%)	
	T0	T2
GF	87,3 $\pm$ 3,0	82,3 $\pm$ 5,5 <sup>a</sup>
GC	91,70 $\pm$ 3,3	89,4 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup>

GF= Grupo Filtrado; GC= Grupo Centrifugado; T0= zero hora pós-descongelamento; T2= duas horas pós-descongelamento. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença entre os tempos de avaliação. Letras minúsculas entre as colunas indicam diferença entre os grupos.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a análise da motilidade subjetiva mostrou uma redução perceptível nos dois grupos, tanto filtrado quanto centrifugado, em duas horas pós-descongelamento. O sêmen asinino congelado pode ser mantido por um longo período em nitrogênio líquido, porém há efeito significativo na redução da motilidade espermática, o que já é esperado devido às alterações bioquímicas encontradas pelos espermatozoides no ambiente adverso da criopreservação (WATSON, 2000).

Neste experimento, os números relacionados à motilidade espermática com diluidor BotuCrio® foram maiores que os relatados por Álvarez et al. (2019), que mostraram que o sêmen asinino pós-descongelado submetido ao mesmo diluidor apresentou as menores porcentagens de motilidade espermática e funcionalidade de membrana, em relação ao diluidor com lactose e colostro. Tal disparidade entre os resultados observados pode ser atribuída a diversos fatores que influenciam na atividade espermática, sejam eles intrínsecos, como a raça do animal, ou mesmo por fatores independentes dele, como o clima o qual está submetido. Climas são caracterizados por individualidades geográficas como a temperatura, e sua diferença é algo bastante determinante para a motilidade do espermatozoide (APPELL, 1977). Partindo do conhecimento que as pesquisas foram realizadas em diferentes países, pode-se relacionar a diferença de temperatura entre eles como um fator a ser levado em consideração nos resultados obtidos.

Em trabalhos de Alvarenga e Papa et al. (2011), o Botucrío®, que contém gema de ovo pasteurizada, apresentou maior porcentagem de motilidade total e fertilidade quando utilizado como diluidor para o sêmen congelado de garanhão. Kampschmidt et al. (1953) sugeriram que as lipoproteínas e os fosfolípidos da gema de ovo protegem os espermatozoides, induzindo resistência ao choque térmico e melhorando a sobrevivência durante o armazenamento. As lipoproteínas hidrossolúveis estão localizadas na fração solúvel da gema e são identificadas como lipoproteínas de baixa densidade (MARTIN et al., 1964). O mecanismo crioprotetor das lipoproteínas de baixa densidade não está completamente elucidado, mas Quinn et al. (1980) sugeriram que os fosfolípidos poderiam formar uma película protetora na superfície da membrana plasmática dos espermatozoides após a ruptura das lipoproteínas de baixa densidade. Observando os valores de motilidade pode-se concluir que o diluidor apresentou o efeito crioprotetor esperado da gema de ovo, implicando em boa resistência das células aos choques térmicos e sobrevivência em meio de criopreservação.

Há controvérsias sobre o efeito da centrifugação e eliminação do plasma seminal no armazenamento do sêmen de jumento (FERREIRA, 1993; MELLO et al., 2000). Serres et al. (2002) relataram que a centrifugação melhora a motilidade e a integridade da membrana plasmática em amostras de sêmen de jumentos. Por outro lado, a centrifugação pode chegar a ser prejudicial, danificando os espermatozoides, necessitando de diluição e concentração eficientes para reduzir esse dano (COCHRAN et al., 1984). Ainda assim, os valores para motilidade total e progressiva obtidas pelo CASA não apresentaram redução significativa entre os tempos, sugerindo que tanto a centrifugação quanto a filtração minimizaram os efeitos deletérios aos espermatozoides asininos quando submetidos a criopreservação.

Os parâmetros VCL e VSL indicam quantitativamente o movimento dos espermatozoides, enquanto ALH e BCF definem a qualidade da cinética. Em relação aos parâmetros cinéticos foi-se verificada diferença entre os tempos apenas no grupo filtrado para a velocidade curvilínea - VCL - cujos valores se aproximam de estudos com espermatozoides asininos criopreservados com o BotuCrio® (ÁLVAREZ et al., 2019). Embora a técnica de filtração não tenha reduzido os parâmetros de motilidade, houve interferência nos valores quantitativos, o que pode indicar um efeito deletério no movimento espermático e pode culminar em menor índice de fertilidade. Sendo assim, a observação de apenas um parâmetro, como a motilidade, não é suficiente ou essencial para definir a viabilidade do espermatozoide em uma possível fertilização, já que parâmetros como o VCL também podem indicar valores preditivos para a fertilidade (LARSEN et al., 2000).

A VCL refere-se à distância total que o espermatozoide percorre em um período de observação, sendo sempre a maior das velocidades que podem ser mensuradas pelo CASA, já a VSL corresponde à distância que o espermatozoide percorre em linha reta do primeiro ao último ponto de observação, sendo geralmente a menor (MORTIMER, 2000). Como a motilidade progressiva não apresentou queda significativa nos grupos filtrado e centrifugado ao longo do tempo, implica-se que a VSL também não sofreria tal redução no seu valor, o que foi observado no estudo.

Os valores encontrados para ALH e BCF das amostras de sêmen utilizadas foram semelhantes aos relatados do sêmen de jumentos Andaluz (DIAZ-JIMENEZ et al., 2013) e menores que o sêmen dos jumentos catalães (MIRÓ et al., 2005). Parâmetros como ALH auxiliam na determinação do comportamento cinético compatível com a hiperativação espermática e já foi determinado que valores acima de 7,0 para sêmen humano (MORTIMER

et al., 1998) e 5,5 para bovino (GILLAN et al., 2008) caracterizam tal comportamento. A hiperativação espermática deve ocorrer próximo ao local da fertilização e sua ativação precoce está associada com uma menor vida útil, reduzindo a capacidade fertilizante, portanto valores elevados de ALH na avaliação pós-descongelamento não são desejados. Pequenas variações de temperatura (40 °C) durante o banho-maria no momento de descongelamento também podem hiperativar a célula (CHAN et al., 1998). Dessa forma, o sêmen descongelado no presente estudo está com características satisfatórias quanto aos valores de ALH, pois este encontra-se reduzido, diminuindo a chance do espermatozoide asinino sofrer hiperativação precoce, reduzir sua vida útil e comprometer seu potencial de fertilização.

A proporção de células espermáticas sem e com anormalidades no presente estudo se mostrou próxima às relatadas por Miró et al. (2005; 2009). De acordo com alguns estudos, a centrifugação poderia causar injúrias aos espermatozoides (SHARMA et al., 1997; AURICH, 2008), porém não no quesito de morfologia espermática (VIDAMENT et al., 2001), o que pôde ser observado nas proporções de espermatozoides sem anormalidades encontradas tanto no sêmen filtrado quanto no centrifugado do atual trabalho.

Quanto ao parâmetro de integridade de membrana, corado com eosina e nigrosina, uma redução foi observada após duas horas de descongelamento no grupo filtrado, contrária ao relato de Neto et al. (2013), que afirmaram a utilização do filtro como sendo melhor que o processo de centrifugação, mantendo a cinética espermática e a integridade de membrana em comparação ao sêmen fresco. Por outro lado, é notória a influência da técnica de avaliação da integridade de membrana plasmática, uma vez que o método de EN difere consideravelmente do método de fluorescência.

A fluorescência é a emissão de luz por uma molécula que absorve a luz ou outra radiação eletromagnética dentro de nanossegundos. Como a diferença entre a energia dos comprimentos de onda de excitação e emissão é uma propriedade única para cada fluorocromo em particular (PLOEM; WALTER, 2001), isto torna o método extremamente sensível, um fator crítico para a acurácia e conseqüente confiabilidade da técnica de epifluorescência em relação a coloração com EN.

No teste de funcionalidade da membrana - HOST - não houve diferença entre os tempos nos dois grupos, porém os percentuais de espermatozoides com membrana funcional foram consideravelmente baixos na avaliação pós-descongelamento do sêmen asinino diluído com BotuCrio®, como observado por Álvarez et al. (2019). Entretanto, Ferrante et al. (2018)



utilizaram o diluidor “Kenney” e EDTA no sêmen sem remoção de plasma seminal como pós-centrifugado, na criopreservação de sêmen de jumento, e observaram que a porcentagem de espermatozoides com membrana funcional foi maior no grupo que não foi centrifugado. Desta forma, é possível afirmar que os métodos de separação do plasma seminal podem influenciar na preservação da funcionalidade da membrana plasmática, provavelmente pela remoção de fatores decapacitantes presentes no plasma, que costumam ser moléculas também do grupo das proteínas, (BEGLEY; QUINN, 1982).

Em relação ao potencial mitocondrial, não foi encontrado relatos na literatura sobre tal parâmetro na congelação ou refrigeração de espermatozoides asininos. No presente estudo, houve uma redução significativa no grupo de espermatozoides filtrados em relação ao tempo, porém mais uma vez o grupo centrifugado se manteve sem alterações significativas, reafirmando sua estabilização e minimização dos efeitos negativos da criopreservação na célula espermática em frente a maioria dos parâmetros avaliados. O potencial mitocondrial apresenta uma forte relação com o potencial energético da célula e com a motilidade (MARTINEZ-PASTOR, 2004; TSAKMAKIDIS et al., 2010), logo está associado com a fertilidade.

Correlacionando os parâmetros anteriores percebe-se uma tendência na qual o grupo filtrado apresenta a mesma redução constante, principalmente nos parâmetros de potencial mitocondrial e VCL. Um baixo potencial de mitocôndria implica em uma menor atividade energética para cinética espermática, o que corrobora para uma menor velocidade curvilínea. No caso de um percentual baixo de espermatozoides com alto potencial de mitocôndria, a explicação pode ser advinda da alta sensibilidade das organelas ao estresse osmótico (MACIAS GARCIA et al., 2011).

De acordo com os valores de integridade acrossomal, foi percebido uma preservação desta estrutura tanto no sêmen previamente filtrado quanto centrifugado. Quando se adicionou a gema de ovo aos diluidores para criopreservação de espermatozoides de jumentos Poitou, observou-se uma maior porcentagem de células com acrossomo intacto, intensificada ainda mais com adição de glutamina (TRIMECHE et al., 1997). Isso pode justificar porque tanto o sêmen filtrado quanto o centrifugado mantiveram altos índices percentuais de integridade acrossomal com o diluidor BotuCrio®, a base de gema de ovo. A reação acrossomal (RA) é um fator prévio e determinante para que haja a capacitação espermática, sendo assim, aglutininas que possuem afinidade com carboidratos presentes na membrana acrossomal

externa são utilizadas para identificar espermatozoides que já iniciaram a RA, ou seja, que estariam capacitados (ARRUDA et al., 2010). De acordo com os dados do presente estudo, tanto a membrana plasmática se manteve íntegra como também os acrossomas, aumentando as chances do sucesso de fertilização pelo sêmen avaliado.

A criopreservação de espermatozoides é realizada a fim de viabilizar uma fertilização desejada futuramente e para que possível, o espermatozoide deve apresentar metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, enzimas acrossomais e proteínas sobre a membrana plasmática (AMANN; PICKETT, 1987). A utilização do BotuCrio® como diluidor de sêmen asinino conseguiu satisfatoriamente atender a grande parte desses requisitos, principalmente quando previamente centrifugado, no qual obteve a melhor estabilidade dos parâmetros de avaliação espermática.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Apesar de utilizado majoritariamente para equinos, o BotuCrio® como diluidor para o sêmen asinino atendeu satisfatoriamente na sobrevivência dos espermatozoides durante o processo de criopreservação, e valores mais estáveis foram encontrados no grupo com plasma seminal retirado através da centrifugação, resultando em viabilidade para fertilização.

Apenas um parâmetro não é suficiente para indicar viabilidade do sêmen para fertilização, assim como a precisão das técnicas mostrou-se extremamente impactante nos resultados obtidos. A predição da fertilidade se torna algo difícil por haver diversos aspectos envolvidos, porém ao associar-se várias técnicas de avaliação do ejaculado, esse objetivo pode ser aproximado da realidade.

Concluindo, o sêmen asinino criopreservado pós-centrifugação revelou ser mais resistente ao tempo de duas horas pós-descongelamento quando comparado ao grupo filtrado, representando: a manutenção da motilidade total e dos parâmetros cinéticos quantitativos e qualitativos, integridade da membrana plasmática e do acrossoma, bem como funcionalidade de membrana e potencial mitocondrial.

## REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. Estrutura da membrana. In: ALBERTS et al. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. p.354-378.
- ALVARENGA, M.A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.38, p.319-333, 2010.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Principais avanços no processamento e aplicação do sêmen congelado de equinos. **Spermova**, v.1, n.1, p.7-10, 2011.
- ÁLVAREZ, C.; LUÑO, V.; GONZÁLEZ, N.; GIL, L. A preliminary study on the use of jenny colostrum to improve quality in extenders for freezing donkey semen. **Cryobiology**, v.87, p.110-114, 2019.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.715-745.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p.145-174, 1987.
- APPELL, R.A.; EVANS, P.R.; BLANDY, J.P. The effect of temperature on the motility and viability of sperm. **British Journal of Urology**, v.49, p.751-756, 1977.
- ARRUDA, R.L.; ORROS, I.R.; PASSOS, T.S.; et al. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.168-184, 2010.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.268-275, 2008.
- BALDI, F.; ALENCAR, M.M.; FREITAS, A.R.; BARBOSA, R.T. Parâmetros genéticos para características de tamanho e condição corporal, eficiência reprodutiva e longevidade em fêmeas da raça Canchim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.247-253, 2008.
- BEGLEY, A.J.; QUINN, P. Decapacitation factors in semen. **Clinical Reproduction and Fertility**, v.1. p.167-175, 1982.
- BICUDO, S.D.; SOUSA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como intensificação do manejo reprodutivo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.120-127, 2003.
- BRAUN, S.; HOCHI, S.; OGURI, N.; SATO, K.; TORRES-BOGGINO, F. Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Cryobiology**, v.32, p.487-492, 1995.
- CALDERAM, I.B.K.; MASCHIO, É.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; RAMBO, G.; CORRÊA, E.K., LUCIA JÚNIOR, T.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Inseminação

artificial intrauterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1978-1983, 2008.

CÂMARA, D.R.; GUERRA, M.M.P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.93-99, 2008.

CANISSO, I.F.; et al. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Ciência Agrária e Ambiental**, v.6, n.3, p.389-398, 2008.

CARNEIRO, G.F.; SILVA, S.V.; MEDEIROS, L.R.D.; et al. Utilização prática de sêmen congelado. In: ASSIST - Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos, 1, 2007. **Anais...**, Gravatá-PE, 2007 (CD-ROM).

CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 3ª Ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013.

CHAN, P.J.; CORSELLI, J.U.; PATTON, W.C.; JACOBSON, J.D.; KING, A. ENHANCED fertility after heat-induced hyperactivation. **Fertility and Sterility**, v.69, n.1, p.118-121, 1998.

CHIRINÉA, V.H.; LOPES, M.D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.595-601, 2009.

CNA: **Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Brasília: CNA, 2006, 70p.

COCHRAN, J.D. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 °C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology**, v.22, p.25-38, 1984.

COSTA, D.N.M., SILVA, D.A.M.; BOAKARI, Y.A.; FERREIRA, S.B.; CASTELO BRANCO, M.A.; SOUZA, J.A.T. Eficiência dos diluidores Tris e Botu-crio® sobre os parâmetros seminais de garanhões das raças quarto de milha e mangalarga marchador. **Ciência Animal Brasileira**, v.15, n.3, p.322-329, 2014.

DAVIES-MOREL, M.C.G. **Equine artificial insemination**. Wallingford, Oxon: CAB International, 1999.

DIAZ-JIMENEZ, M.; DORADO, J.; ORTIZA, I.; CONSUEGRA, C.; PEREIRA, B.; GONZALEZ-DE CARA, C.A.; AGUILERA, R.; MARIB, C.; MISLEIC, B.; LOVE, C.C.; HIDALGO, M. Cryopreservation of donkey sperm using non-permeable cryoprotectants. **Animal Reproduction Science**, v.189, p.103-109, 2013.

EL WISHY, A.B. Testicular and Epididymal sperm reserves in the ass (*Equus asinus*) and stallion (*equus caballus*). **Zeitschrift Fur Tierzucht Und Zuchtungsbiologie**, v.91, p.334-344, 1975.

FAGUNDES, B. VAN TILBURG, M.F.; SILVA, J.F.S.; SHIMOYA, A.; BARRETO, M.A.P.; FERREIRA, V.M. Adição de insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p.273-278, 2010.

FAHY, G.M. Analysis of “solution effects” injury. Equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. **Biophysical Journal**, v.32, n.2, p.837-850, 1980.

FERRANTE, A.A.; CASTEX, C.B.; BRUNO, S.; ARRAZTOA, C.; PLAZA, J.; NEILDA, D.; MIRAGAYA, M. Comparison of Whole and Centrifuged Egg-Yolk Added to Kenney’s and Lactose-EDTA Extenders for Donkey Semen Cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.66, p.76-77, 2018.

FERREIRA, M.F.L. **Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e fertilidade do sêmen de jumento**. 1993. 67f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, 1993.

FERREIRA, M.F.L.; HENRY, M. Effect of cooling rates and extenders on sperm longevity in donkeys. In: WORLD VETERINARY CONGRESS, 24, 1991, Rio de Janeiro, **Anais...** Rio de Janeiro: Soc. Bras. Med. Vet., 1991, p.80. (Resumo).

FICKEL, J.; WAGNER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v.53, p.81-89, 2007.

GARCIA, B.M.; MORAN, A.M.; FERNÁNDEZ, L.G.; FERRUSOLA, C.O.; RODRIGUEZ, A.M.; BOLAÑOS, J.M.; DA SILVA, C.M.; MARTÍNEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic induced stress: role of c-Jun 60 Nterminal kinase (JNKs) pathway. **Journal of Andrology**, v.33, p.105-113, 2011.

GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; JOERG, H.W.; et al. Fluometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1401-1407, 1997.

GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.V.; et al. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v.103, p.201-214, 2008.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v.84, p. 2089-2100, 2006.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª Ed. São Paulo: Manole, 2004.

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.S.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Motility and fertility of stallion spermatozoa cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. **Biology of Reproduction**, v.1, p.753-759, 1996.

HENRY, M.; McDONNELL, S.; LODI, L.D.; GASTAL, E.L. Pasture mating behaviour of donkeys (*Equus asinus*) at natural and induced oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.44, p.77-86, 1991.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.3, p.3-22, 2000.

KAMPSCHMIDT, R.F.; MAYER, D.T.; HERMAN, H.A. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. **Journal of Dairy Science**, v.36, p.733-742, 1953.

KARESKOSKI, A.M.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.33-38, 2006.

KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y.; SEITA, Y.; et al. Comparison of glycerol, lasctamide, actamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v52, n.4, p.511-516, 2006.

KATILA, T. Sperm-uterine interactions: a review. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.267-272, 2001.

LARSEN, L. SCHEIKE, T.; JENSEN, T.K.; BONDE, J.P.; ERNST, E.; HJOLLUND, N.H.; ZHOU, Y.; SKAKKEBÆK, N.E.; GIWERCMAN, A. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. **Human Reproduction**, v.15, n.7, p.1562–1567, 2000.

LAUNAY, F. **Etude de la conservation de la semance de Baudet Du poitou**. 1990. 150f. Tese (Doutorado). École Nationale Vétérinaire de Nantes, France.

MACPHERSON, M.L.; SIMMEN, R.C.M.; SIMMEN, F.A.; HERNANDEZ, J.; SHEERIN, B.R.; VARNER, D.D.; LOOMIS, P.; CADARIO, M.E.; MILLER, C.D.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.; BLANCHARD, T.L. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 equine seminal plasma: Association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, v.67, p.648-654, 2001.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.33, n.4, p.183-193, 2009.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53, p.10-19, 2002.

MANN, T.; MINOTAKIS, C.S.; POLGE, C. Semen composition and metabolism in the stallion and jackass. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.5, p.109-122, 1963.

MARTIN, W.G., AUGUSTYNIAK, J.; COOK, W.H. Fractionation and characterization of the low-density lipoproteins of hen's egg yolk. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.84, p.714-720, 1964.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.121-133, 2004.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

MELLO, S.L.V.; HENRY, M.; SOUZA, M.C.; OLIVEIRA, S.M.P. Effect of split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserved at 5 °C. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n.4, p.372-378, 2000.

MENDES, L.N. **Avaliação morfométrica de cascos de jumento pêga**. 2009. 41f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Zootecnia) - Universidade Federal de São João Del Rei. Minas Gerais. 2016.

MILLER, D. J.; WINER, M. A.; AX, R. L. Heparin-binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. **Biology of Reproduction**, v.42, n.5-6, p.899-915, 1990.

MIRÓ, J.; TABERNER, E.; RIVERA, M.; PEÑA, A.; MEDRANO, A.; RIGAU, T.; PEÑALBA, A. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. **Theriogenology**, v.72, n.8, p.1017-1022, 2009.

MORAES, N.L. História e origem dos jumentos. 2009. Disponível em: <[www.oocities.org/asininos/jum-info.html](http://www.oocities.org/asininos/jum-info.html)>. Acesso em: 30 de março de 2019.

MORTIMER, S.T.; SWAN, M.A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactive activation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.13, n.8, p.2139-2146, 1998.

NISHIKAWA, Y. Studies on reproduction in horses. **Japan Racing Association**, Shiba Tamuracho Minatoku, Tokyo, Japan, 1959.

NUNES, J.F. Inseminação artificial em caprinos. In: GONSALVEZ, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, p.111-125, 2002.

OLIVEIRA, E.C.S.; JULIANI, G.C.; MARQUES Jr, A.P.; HENRY, M. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.1116-1122, 2006.

OSORIO, J.P. **Efeito da adição fracionada de dimetil formamida e das curvas de congelamento na viabilidade in vitro pós-descongelamento do espermatozoide equino**. 2006. 61f. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte - MG.



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

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.289-302, 1987.

PLOEM, J.S.; WALTER, F. Multi-wavelength epi-illumination in fluorescence microscopy. **Leica Microsystems CDR**. [S.l.: s.n.], 2001. Disponível em: <<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/multi-wavelength-epi-illumination-in-fluorescence-microscopy/>>. Acesso em: 30 de março de 2019.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225, 2006.

QUINN, P.J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. **Journal of Reproduction Fertility**, v.60, p.403-407, 1980.

RAMIRES NETO, C. et al. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. **Theriogenology**, v.79, p.1120-1123, 2013.

ROTA, A., BASTIANACCI, V.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Evaluation of Plasma Membrane Integrity of Donkey Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.228-232, 2010.

ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, L.M. BUSH, L.M.; WILDT, D.E.; BUSH, M. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, v.58, p.475-482, 1998.

RUMASZKAN, G.; JUNQUEIRA, R.R. O cavalo. Belo Horizonte: **Itatiaia**, v.1, p.11, 1980.

SERRES, C. RODRIGUEZ, A.; ALVAREZ, A.L.; SANTIAGO, I.; GABRIEL, J.; GOMEZ-CUETARA, C.; MATEOS, E. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen. **Theriogenology**, v.58, n.2-4, p.329-332, 2002.

SHARMA, R.K; VERMULAPALLI, S.; KOHN, S.; AGARWAL, A. Effect of centrifuge speed, refrigeration medium and spermwashing medium on cryopreserved sperm quality after thawing. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v.39, p.33-38, 1997

SIEME, H. et al. Equine semen cryopreservation: inter-individual variation, centrifugation processing, protective agents, and freezing protocols. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.1, p.11-14, 2015.

SIEME, H.; MARTINSSON, G.; RAUTERBERG, H.; WALTER, K.; AURICH, C.; PETZOLDT, R.; KLUG, E. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.134-140, 2003.

- SILVA, A.R.; FONTENELLE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S; SILVA, L.D.M. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.595-601, 2009.
- SWANSON, W.F. The role of science and reproductive biotechnology in establishing and managing the Brazilian ocelot population in U.S. and Brazilian zoos. In: **Annual Conference Proceedings of the American Zoo & Aquarium Association**. Fort Worth, TX, p.75–78, 2002.
- SWANSON, W.F.; BROWN, J.L. International training programs in reproductive sciences for conservation of Latin American felids. **Animal Reproduction Science**, v.82/83, p.21-34, 2004.
- THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, n.8, p.1531-1550, 2006.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER D. A procedure for poitou jackass sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v.50, n.5, p.793-806, 1998.
- TRIMECHE, A.; TAINTURIER D. Comparison of two poitou jackasses sperm freezing methods and optimization of glycerol concentration. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.148, p.439-444, 1997.
- TROEDSSON, M.H. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v.52, p.461-471, 1999.
- TSAKMAKIDIS, I.A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. **Small Ruminant Research**, v.92, p.126-130, 2010.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M. et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, v.58, p.249-251, 2001.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.481-492, 2000.
- WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.62, p.483-492, 1981.
- WILLIAMS, A.C.; FORD, W.C.L. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. **Fertility and Sterility**, v.83, n.4, p.929-936, 2005.
- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**, New York: Raven Press, 1994, p.189-317.

## GLOSSÁRIO

<b>Biotécnicas</b>	Procedimentos associados ao conhecimento biotecnológico.
<b>Centrifugação</b>	Separação pela força centrífuga.
<b>Criopreservação</b>	Processo onde células ou tecidos biológicos são preservados através do congelamento a temperaturas muito baixas.
<b>Crioprotetor</b>	Substância que oferece energia, proteção contra os danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada.
<b>Ejaculado</b>	Flexão de ejacular. Libera o sêmen em um ato sexual.
<b>Fertilização</b>	Junção de gametas que originam o zigoto
<b>Gametas</b>	Células responsáveis pela reprodução sexuada.
<b>Hiperativação</b>	Estado cinético da célula capacitada a fertilização.
<b>Inseminação Artificial</b>	Técnica de reprodução assistida que consiste na deposição artificial do sêmen nas vias genitais da fêmea ou in vitro.
<b>Motilidade</b>	Competência para se mover; mobilidade.
<b>Osmolaridade</b>	Número de partículas de soluto contidas em um volume.
<b>Permeabilidade</b>	Qualidade dos corpos que se deixam atravessar.
<b>Peroxidação lipídica</b>	Degradação oxidativa de lipídios.
<b>Polissacarídeo</b>	Carboidrato composto por uma quantidade significativa de monossacarídeos (açúcares simples).
<b>Radicais livres</b>	Moléculas instáveis, apresentam um elétron que tende a se associar de maneira rápida a outras moléculas de carga positiva com as quais pode reagir ou oxidar.
<b>Reprodução Assistida</b>	Contempla o uso de diferentes técnicas para auxiliar a reprodução.
<b>Teste de termo resistência</b>	Procedimento para verificar a resistência de um determinado material biológico à diferença de temperatura pós-descongelação com o passar do tempo.
<b>Transferência de embriões</b>	Técnica que consiste na superovulação induzida de uma fêmea doadora, seguida da inseminação artificial, formação de embriões e transferência para fêmeas receptoras.