

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO EM COLOIDE DE CAMADA ÚNICA E DE  
DIFERENTES DILUENTES DE CONGELAMENTO SOBRE QUALIDADE DO  
SÊMEN EQUINO**

**AMANDA BARICATTI FINAZZI**

**RECIFE**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**AMANDA BARICATTI FINAZZI**

**EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO EM COLOIDE DE CAMADA ÚNICA E DE  
DIFERENTES DILUENTES DE CONGELAMENTO SOBRE QUALIDADE DO  
SÊMEN EQUINO**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

**RECIFE**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

F491e Finazzi, Amanda Baricatti  
Efeitos da centrifugação em coloide de camada única e de diferentes diluentes de congelamento sobre qualidade do sêmen equino / Amanda Baricatti Finazzi. – Recife, 2016.  
54 f. : il.

Orientador: Gustavo Ferrer Carneiro.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2016.  
Inclui referências e anexo(s).

1. Criopreservação 2. Reprodução eqüina 3. Sondas fluorescentes 4. CASA 5. Citometria de fluxo I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orientador II. Título

CDD 636.089

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

**EFEITOS DA CENTRIFUGAÇÃO EM COLOIDE DE CAMADA ÚNICA E DE  
DIFERENTES DILUENTES DE CONGELAMENTO SOBRE QUALIDADE DO  
SÊMEN EQUINO**

Dissertação elaborada por

---

**AMANDA BARICATTI FINAZZI**

Dissertação aprovada em 10 de junho de 2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador - Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Universidade Federal Rural de Pernambuco / Unidade Acadêmica Garanhuns

---

Membro Titular - Dr. André Mariano Batista

Universidade Federal Rural de Pernambuco / Departamento de Medicina Veterinária

---

Membro Titular - Profa. Dra. Sildivane Valcácia Silva

CBiotec / Universidade Federal da Paraíba

Dedico esse trabalho ao meu pai, Luis Carlos, por ter me ensinado a ser realista, organizada e a mostrar para as pessoas que são importantes na minha vida, que elas sempre soubessem disso. Obrigada por ter me tornado essa pessoa tão especial e única que eu acredito que sou.

À minha mãe, Vera Lúcia, por me ensinar que todos os sonhos valem a pena que a gente tente que eles se tornem realidade, se não derem certo, não tem problema, o que a vale no final foi que você tentou.

Ao meu irmão, Felipe, me ensinou que tem certas coisas na vida, que mesmo que a gente ache que não conseguirá viver sem, a gente consegue. Ensinou-me que se as pessoas não te respeitarem, afaste-se delas e se dê o valor que realmente você acha que merece.

Agradeço ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro. Minha admiração pelo profissional de tão elevada capacidade, a quem devo a gratidão por fornecer subsídios para meu desenvolvimento profissional. Meu respeito, pelo ser humano grandioso. Orgulho-me em dizer que sou sua orientada. Não aprendi somente a Medicina Veterinária, mas também poesias, histórias, contos, que ficarão guardados com muito carinho em minhas lembranças.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra, por ter gentilmente disponibilizado o Laboratório de Andrologia Animal da UFRPE - ANDROLAB, para a execução desse trabalho.

Ao Dr. André Mariano Batista, responsável pelo Laboratório de Andrologia Animal da UFRPE - ANDROLAB, pelas orientações e sugestões preliminares de nossos estudos, pelo apoio durante o desenvolvimento das análises e pela disponibilidade do laboratório para realização do meu experimento. Agradeço pela compreensão pelo momento difícil que estava passando e por ter me encaixado na rotina do laboratório.

Ao colega Dr. Márcio Menezes Nunes (Médico Veterinário, Membro do departamento Técnico da Empresa Minitub do Brasil) pelas orientações e sugestões preliminares de nossos estudos, pelo apoio durante o desenvolvimento inicial das análises, por nos fornecer gentilmente os meios utilizados neste experimento.

À Empresa Minitub do Brasil, por nos disponibilizar os meios para utilizarmos neste experimento, meu sincero agradecimento.

Ao colega do Laboratório de Reprodução Animal da UFRPE/UAG, M.V. Breno Barros Santana, que me auxiliou durante os estudos e sugestões preliminares do meu experimento, durante toda parte inicial e processamento das amostras, meu agradecimento pela sua dedicação e paciência.

À colega do Laboratório de Reprodução Animal da UFRPE/ANDROLAB, Ms. Lúcia Cristina Pereira Arruda, que me auxiliou durante toda análise laboratorial dos resultados, meu agradecimento pela sua dedicação e paciência.

Ao M.V. Oswaldo Christiano Gomes Neto, Médico Veterinário responsável pelo Haras Monte Verde, que dispensou parte dos seus dias, nos auxiliando na parte inicial deste experimento, nos disponibilizando seu Laboratório, no Haras Monte Verde, minha sincera gratidão.

Ao Sr. Paulo Otávio Freire Macedo, proprietário do Haras Monte Verde, que gentilmente nos disponibilizou o espaço de sua propriedade e seus animais para que esse estudo fosse possível, meu respeito e admiração por montar um Haras tão organizado e funcional.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral Viana, da PUC-MINAS/Poços de Caldas, com quem tive as primeiras aulas de Fisiologia Reprodutiva da Fêmea, e me encantei por essa área e quem plantou essa idéia na minha cabeça, sobre realizar uma Pós-Graduação.

Ao Prof. Ms. Aduino de Carvalho Rosas Filho, da PUC-MINAS/Poços de Caldas, com quem tive as primeiras aulas de Fisiologia Reprodutiva do Macho e Equinocultura, em que me encantei pelos cavalos, doces animais.

Ao Prof. José Wilton Pinheiro Júnior, da UFRPE/UAG e ao colega Júnior Mário Baltazar de Oliveira - Doutorando em Ciência Veterinária (UFRPE/UAR), pela disponibilidade em auxiliar nas análises estatísticas deste experimento.

Aos colegas do Laboratório de Reprodução Animal da UFRPE/ANDROLAB, Igor Henrique de Azevedo Valença Nery e Helder Melo de Souza, pelo auxílio durante o desenvolvimento do meu experimento.

Aos colegas da graduação, Pollyanne Raysa Fernandes de Oliveira, Ewerton Renner Gomes de Oliveira e Karla Adrielen do Nascimento, pelo auxílio durante o desenvolvimento do meu experimento.

À CAPES, Fundação Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo suporte financeiro, por meio da concessão da bolsa de estudo.

À banca de defesa pela disponibilidade em aceitar participar e compartilhar comigo deste momento tão importante em minha carreira.

Aos meus pais, meu irmão, à toda minha família e amigos que me deram apoio com palavras de força e coragem, e que não me deixaram desistir desse sonho, apesar de todas as dificuldades enfrentadas. Amo vocês!

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> O espermatozoide e suas partes.....	18
<b>Figura 2.</b> Reação acrossômica e penetração do espermatozoide no oócito.....	20
<b>Figura 3.</b> Supostas alterações no espermatozoide durante o congelamento e descongelamento.....	23
<b>Figura 4.</b> Canais não congelados.....	24
<b>Figura 5.</b> Imagem feita por Citometria de Fluxo das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI e FITC-PNA.....	32

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

<b>Tabela 1.</b> Resultados das análises pós-descongelamento referentes à cinética espermática e a integridade das membranas plasmática e acrossomal.....	54
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{m}$	micrômetro
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	isotiocianato de fluoresceína
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
x g	gravidade
Hz	Hertz
IA	inseminação artificial
ISCI	injeção intracitoplasmática de espermatozoide
mL	mililitro
mW	mega watt
n	número de unidades experimentais
N <sub>2</sub> líquido	nitrogênio líquido
PBS	tampão fosfato salino
pH	potencial de hidrogênio
s	segundo
sptz	espermatozoide

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	percentagem
x	vezes
10 <sup>6</sup>	milhões
®	marca registrada
+	mais / positivo
-	menos / negativo
/	barra

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da centrifugação em coloide de camada única (AndroColl<sup>®</sup>-E; Minitub, Alemanha) e três diluentes de congelamento: diluente 1 (Botucrio<sup>®</sup>; Biotech, Botucatu, Brasil), diluente 2 (EquiPlus Freeze<sup>®</sup>; Minitub, Alemanha + 3% glicerol) e diluente 3 (EquiPlus Freeze<sup>®</sup>; Minitub, Alemanha + 3% DMSO), sobre a qualidade do sêmen equino. Utilizou-se 3 ejaculados de 5 garanhões (n=15). Após a colheita, o sêmen foi diluído com meio à base de leite desnatado (EquiPlus<sup>®</sup>, Minitub, Alemanha) e dividido em 2 grupos: grupo E (centrifugado sem coloide) e grupo A (centrifugado com coloide). No grupo E, o sêmen foi centrifugado à 676g por 15 minutos, no grupo A, o sêmen foi centrifugado à 314g por 20 minutos. Após a centrifugação, os grupos receberam os diferentes diluentes: diluente 1, diluente 2 e diluente 3. Logo após foram levadas ao congelamento em máquina programável portátil e armazenadas em botijões criogênicos. A cinética foi avaliada pelo CASA e a integridade das membranas plasmática e acrossomal, por associação de sondas fluorescentes submetidas ao Citômetro de Fluxo. Com relação aos parâmetros do CASA, pode-se observar que o grupo A1, centrifugado com o coloide, teve resultado superior nas variáveis LIN e WOB, comparadas com o grupo E1. Já as variáveis, RAP, VCL, VAP, ALH e BCF, tiveram resultados inferiores quando centrifugadas com o colóide, grupo A1 em relação ao grupo E1. Com relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal, pode-se observar que os grupos A1 e A3, que foram centrifugados com o coloide, tiveram resultado superior aos grupos E1 e E3, que foram centrifugados sem o coloide. O uso do coloide melhorou integridade das membranas plasmática e acrossomal, provavelmente evitou o processo da hiperativação espermática e proporcionou menor produção de ROS. Maiores estudos *in vivo* serão necessários para comprovação desta técnica.

**Palavras-chave:** criopreservação, reprodução equina, sondas fluorescentes, CASA, Citometria de Fluxo.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of a colloid in single layer centrifugation (AndroColl®-E; Minitub, Germany) associated to three freezing extenders: extender 1 (Botucio®; Biotech, Botucatu,, Brazil), extender 2 (EquiPlus Freeze®; Minitub, Germany + 3% glycerol) and extender 3 (EquiPlus Freeze®; Minitub, Germany + 3% DMSO) on equine semen quality. We used three ejaculates from five stallion (n=15), collected by artificial vagina. After collection, the semen was diluted with extender to from skimmed milk (EquiPlus®, Minitub, Germany) and divided into 2 groups: group E (centrifuged without colloid) and group A (centrifuged with colloid). No grupo E, o sêmen foi centrifugado à 676g por 15 minutos, no grupo A, o sêmen foi centrifugado à 314g por 20 minutos. Após a centrifugação, os grupos receberam os diferentes diluentes: diluente 1, diluente 2 e diluente 3. The kinetics was evaluated by CASA and the integrity of plasma and acrossomal membrane by association of fluorescent probes and subjected to flow cytometry. With respect to the CASA parameters, it can be seen that the A1 group, with the colloid centrifuged, had superior result in LIN and WOB variables, compared to the E1 group. The variables, RAP, VCL, VAP, ALH and BCF, had lower results when centrifuged with colloid, A1 group than in the group E1. With respect to the integrity of plasma and acrossomal membrane, it can be seen that A1 and A3 groups were centrifuged with colloid, they had superior result to E1 and E3 groups, which were centrifuged without the colloid. The use of colloid improved integrity of plasma and acrossomal membranes probably avoided the process of sperm hyperactivation and provided lower production of ROS. Greater *in vivo* studies are needed to prove this technique.

**Keywords:** cryopreservation, equine reproduction, fluorescent probes, CASA, Flow Cytometry.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1. O espermatozoide e suas membranas.....	18
3.2. Criopreservação do sêmen.....	20
3.2.1. Meios de congelamento de sêmen.....	25
3.2.2. Crioprotetores.....	25
3.2.3. Meios de centrifugação de sêmen.....	28
3.2.3.1. Centrifugação em camada única.....	28
3.3. Análises espermáticas computadorizadas.....	29
3.3.1. Análise da cinética espermática.....	29
3.3.2. Análise de integridade de membrana.....	30
4. REFERÊNCIAS.....	32
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	39

## 1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial é a biotecnia da reprodução mais importante e mais utilizada para melhoramento genético animal, teve início em 1957 com a primeira gestação equina gerada por espermatozoides criopreservados (OLIVEIRA et al., 2013). A inseminação artificial associada a criopreservação do sêmen maximizam o potencial genético do reprodutor, possibilitando um maior número de descendentes geneticamente superiores; melhoria do controle de doenças sexualmente transmissíveis (FÜRST, 2006); redução de custos e estresse do transporte; utilização do sêmen de garanhões em competição ou se recuperando de alguma afecção e armazenamento e possibilidade de uso do sêmen mesmo após a morte do garanhão (PIMENTEL; CARNEIRO, 2008).

O uso do sêmen congelado ainda é restrito na rotina do campo, pois essa biotecnologia necessita de controle rigoroso da atividade ovariana, indução da ovulação, inseminação realizada no momento mais próximo possível da ovulação e ainda apresenta índices reprodutivos menores que os resultados obtidos com uso do sêmen fresco ou resfriado (SQUIRES et al., 2000).

Após vários estudos, sabe-se que grande parte dos garanhões possui características peculiares de sêmen pós-descongelamento (motilidade espermática e integridade de membrana celular) inadequadas para o seu uso (SQUIRES et al, 1999), havendo até denominação: “bad freezers” e “good freezers”, para animais que o sêmen congela mal e bem, respectivamente. Isso se deve ao fato da espécie equina ter sido selecionada por fenótipo e desempenho, e a fertilidade do garanhão, normalmente é ignorada nos programas de melhoramento genético (MACÍAS GARCÍA et al., 2009).

O processo de criopreservação causa danos à integridade estrutural, bioquímica e biofísica da membrana plasmática (MP) do espermatozoide, resultando em menor fertilidade do sêmen após a descongelamento, pois ocorre uma perda de aproximadamente 50% dos espermatozoides (FÜRST, 2006). Estudos comprovam que a utilização de sêmen fresco ou resfriado tem taxa de fertilidade maior do que o sêmen congelado (OLIVEIRA et al., 2013).

Vários protocolos são desenvolvidos e testados na tentativa de maximizar a utilização do sêmen equino congelado, procurando diminuir os danos causados pelo processo de criopreservação, melhorando assim as taxas de fertilidade.

Os primeiros meios de congelamento de sêmen equino não tinham a presença de um agente crioprotetor (SQUIRES et al.,1999). Após a introdução de agentes crioprotetores, como o glicerol, diversos meios de congelamento foram elaborados. Apesar de o glicerol ser o

crioprotetor mais utilizado, têm sido utilizados crioprotetores alternativos como o etilenoglicol, metilformamida, dimetilformamida e dimetilsulfóxido (DMSO), e obtiveram resultados similares ou superiores ao glicerol (SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005).

Um novo método de centrifugação tem sido usado para melhorar a qualidade do sêmen de garanhões. Essa centrifugação é feita depositando o sêmen sobre uma única camada de sílica coloidal, com formulação específica da espécie Equina (AndroColl® Equine). Esse método de centrifugação é conhecido como centrifugação em camada única (Single Layer Centrifugation - SLC) (MORREL et al., 2013). Segundo Morrel e Rodriguez-Martinez (2009), a SLC seleciona espermatozoides com boa motilidade, morfologia normal, as membranas intactas e boa integridade da cromatina.

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da centrifugação em coloide de camada única: AndroColl® Equine e três diluentes de congelamento: Botucurio®, EquiPlus Freeze® + 3% glicerol e EquiPlus Freeze® + 3% DMSO sobre a qualidade do sêmen equino e relacionar aos seus efeitos sobre os parâmetros da cinética espermática e sobre a integridade da membrana plasmática e acrossomal.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar o efeito da centrifugação em coloide de camada única e três diluentes de congelamento sobre a qualidade do sêmen equino.

### **2.2 Objetivos Específicos**

a) Estudar a qualidade dos espermatozoides equinos submetidos à criopreservação com três diferentes diluentes de congelação:

- diluente comercial A,
- diluente comercial B + 3% glicerol,
- diluente comercial B + 3% DMSO.

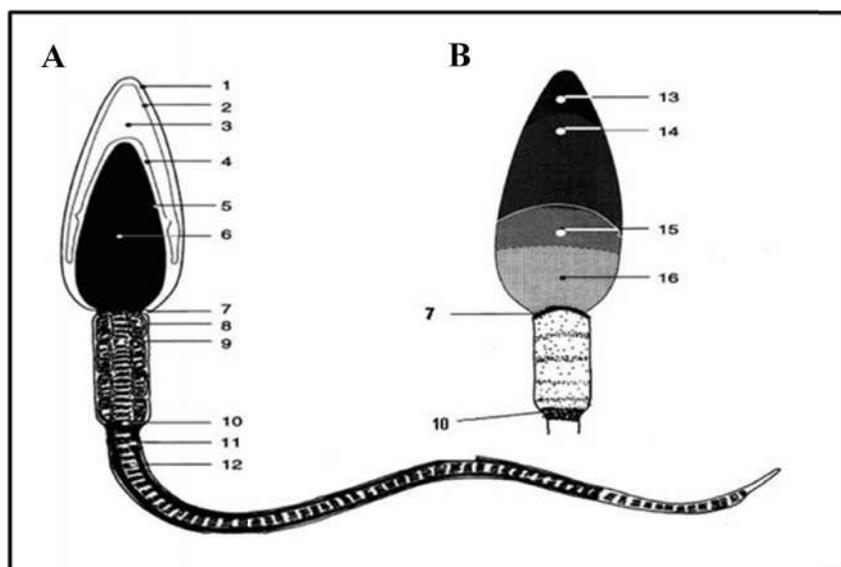
b) Estudar a melhoria da qualidade dos espermatozoides equinos submetidos à criopreservação com e sem coloide de centrifugação em camada única.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O espermatozoide e suas membranas

O espermatozoide de garanhão é constituído por 3 regiões fundamentais (Figura 1): Cabeça = (1) membrana plasmática (MP) que reveste a célula espermática, (2) membrana acrossomal externa, (3) acrossomo, (4) membrana acrossomal interna, (5) núcleo, (6) envelope nuclear, (7) anel nuclear; Peça Intermediária = (8) mitocôndrias, (9) parte proximal do flagelo, (10) anel anular; Cauda = (11) parte distal do flagelo, (12) bainha de revestimento. A porção anterior da cabeça (Figura 2) é composta pelo acrossomo, o qual é subdividido em: (13) região apical, (14) pré-apical, (15) equatorial e (16) pós-equatorial (GADELLA et al., 2001).

**Figura 1.** O espermatozoide e suas regiões



A- Espermatozoide completo, B- Destaque da região da cabeça.

**Fonte:** Adaptado de Gadella et al., 2001.

Para fertilizar o oócito, o espermatozoide precisa apresentar pelo menos quatro atributos pós-descongelção: (1) metabolismo para produção de energia, (2) motilidade progressiva, (3) enzimas acrossomais intactas, (4) e proteínas de MP, importantes para a sobrevivência do espermatozoide dentro do trato reprodutivo feminino e para a junção do mesmo ao oócito no momento da fertilização (COTTORRELLA; HENRY, 2002).

As membranas são compostas, arranjadas em bicamadas hidrofílicas, externamente e de cadeias de ácido graxo hidrofóbicas, internamente (AMANN; PICKETT, 1987). A sua bicamada lipídica contém: fosfolipídios, colesterol, glicolipídeos e diferentes tipos de proteínas, e estas, são classificadas como integrais, que são destacadas da membrana apenas por solventes, e periféricas, que são solúveis nos diluidores de sêmen ou na água (COTTORRELLLO; HENRY, 2002).

A MP dos espermatozoides no processo de criopreservação é uma das principais estruturas danificadas, tanto pelos efeitos de solução como pela formação de cristais intracelulares (ZAHN, 2006). O componente das membranas interna e externa do acrossoma, nuclear e mitocondrial são os elementos mais suscetíveis aos danos causados pela queda da temperatura (FÜRST, 2006).

A integridade estrutural da MP é determinada pela temperatura e pela solução na qual ela está banhada; na temperatura corporal a membrana está fluída. A fluidez da membrana é a capacidade dos fosfolipídeos de se movimentarem lateralmente (AMANN; PICKETT, 1987; COTTORRELLLO; HENRY, 2002; OLIVEIRA, 2002). Com a queda da temperatura, os lipídeos passam pela transição de estado fluído para gelatinoso; as cadeias de ácidos graxos que estavam aleatoriamente distribuídas ordenam-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida e tornando essas áreas fracas e suscetíveis a rupturas e fusões, como também permeáveis a íons (HAMMERSTEDT et al., 1990); assim os lipídeos ficam impossibilitados de se moverem aleatoriamente, resultando na formação de domínios cristalinos (NASCIMENTO, 2006), com apenas pequenas regiões de lipídios no estado líquido onde ficam aderidas as proteínas. Esta agregação de proteínas resulta num aumento da permeabilidade da membrana e decréscimo da atividade metabólica (COTTORRELLLO; HENRY, 2002).

O acrossomo ou capa acrossomal, é uma estrutura de dupla parede situada entre a MP e a porção anterior do núcleo. Esta estrutura, semelhante a um capuchão, contém várias enzimas hidrolíticas, incluindo pró-acrosina, hialuronidase, esterases entre outras, que estão envolvidas no processo de fertilização (NEVES, 1998).

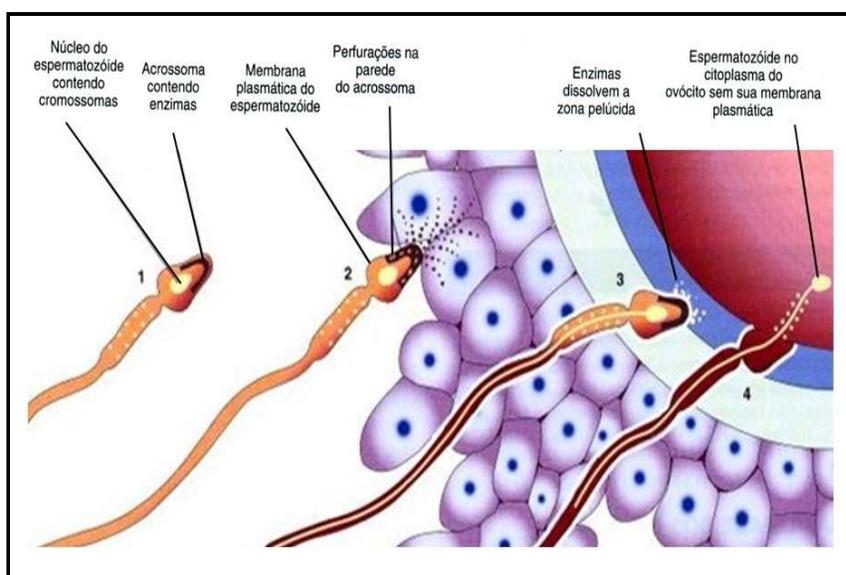
De acordo com Morrel (2011), têm sido discutidos ao longo das duas últimas décadas, mecanismos de seleção espermática dentro do trato reprodutor feminino, os quais permitem que somente um único espermatozoide morfológicamente normal, com membrana intacta e boa integridade da cromatina, passem para o local da fertilização.

Para que o espermatozoide seja considerado viável, suas membranas devem estar íntegras e semipermeáveis. Porém, se a membrana plasmática estiver intacta, mas

funcionalmente instável, o espermatozoide não será capaz de fertilizar o oócito (BATISTA; GUERRA, 2010).

A manutenção da membrana do espermatozoide íntegra é fundamental para a reação acrossômica (Figura 2), um importante evento fisiológico, que envolve a fusão da MP espermática e a membrana acrossomal externa, com subsequente vesiculação e liberação de conteúdos do acrossoma (penetração na zona pelúcida) e a fecundação (CASEY et al., 1993; GOULART et al., 2004).

**Figura 2.** Reação acrossômica e penetração do espermatozoide no oócito



1- Espermatozoide durante a capacitação, 2- Espermatozoide sofrendo reação acrossômica, 3- Espermatozoide formando caminho através da zona pelúcida, 4- Espermatozoide entrando no citoplasma do oócito.

**Fonte:** Adaptado de Moore e Persaud, 2008.

Os espermatozoides devem apresentar uma série de características para fertilização do oócito (ARRUDA et al., 2007), tais como integridade de membrana plasmática e acrossomal (SILVA; GADELLA, 2006).

### 3.2 Criopreservação do Sêmen

A criopreservação de sêmen é estudada desde a descoberta do agente crioprotetor glicerol em 1949, pelo cientista inglês Polge (COTTORRELLA; HENRY, 2002). A

inseminação artificial, biotécnica da reprodução mais importante e mais utilizada para melhoramento genético animal, teve início em 1957 com a primeira gestação equina gerada por espermatozoides criopreservados (PICKETT; AMANN, 1993).

O processo de criopreservação do sêmen inclui todas as etapas, desde sua colheita até a manutenção da viabilidade dos espermatozoides, por um determinado período de tempo após a descongelação (FÜRST, 2006).

As taxas alcançadas com sêmen criopreservado são menores do que as alcançadas com sêmen fresco e resfriado, razão pela qual, esta fertilidade baixa pode ser atribuída ao declínio na motilidade progressiva do espermatozoide após a criopreservação e as crioinjúrias que o espermatozoide sofre durante este processo (SCHEMBRI et al., 2002). O sucesso na criopreservação do sêmen equino depende das interações entre o diluidor, crioprotetor e curvas de resfriamento e aquecimento, buscando minimizar os danos causados pelo choque térmico, formação de cristais de gelo e desidratação celular (AMANN; PICKETT, 1987; COTTORRELLLO; HENRY, 2002; JASKO, 1994). A criopreservação ideal deve, então, ter o compromisso de preservar o maior número de células possíveis e a integridade de diferentes estruturas espermáticas (NASCIMENTO, 2006).

No processo de criopreservação, o sêmen é inicialmente resfriado à temperatura ambiente (37 a 20 °C), o que parece não ocasionar maiores danos aos espermatozoides, quando este se encontra diluído em meio adequado (KETH, 1998). Durante a fase de transição da membrana plasmática, de seu estado líquido para o estado gel, o espermatozoide está mais suscetível a danos causados pelo resfriamento (FÜRST, 2006).

Para minimizar esse efeito, controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19 a 8 °C, deve-se adicionar lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente, além do uso de curvas de resfriamento lentas (-0,05 °C/min), são medidas necessárias para diminuir os danos causados pelo choque frio (FÜRST, 2006).

A etiologia do choque pelo frio envolve o dano à membrana celular e a alteração da função metabólica, provavelmente causadas por alteração no arranjo de constituintes da membrana (MEDEIROS et al., 2002), alterando a orientação dos lipídeos, que podem afetar a estabilidade da membrana ou induzir esta a um rearranjo das moléculas, com formação de pontos de fragilidade, que levam a permeabilidade excessiva ou mesmo à ruptura da MP (NEVES, 1998). O choque pelo frio é evidenciado pela presença de muitos espermatozoides movimentando em círculos, perda prematura da motilidade, produção de energia diminuída, permeabilidade aumentada da membrana e perda das moléculas intracelulares e íons. O principal entrave no sucesso da criopreservação do sêmen equino está diretamente relacionado

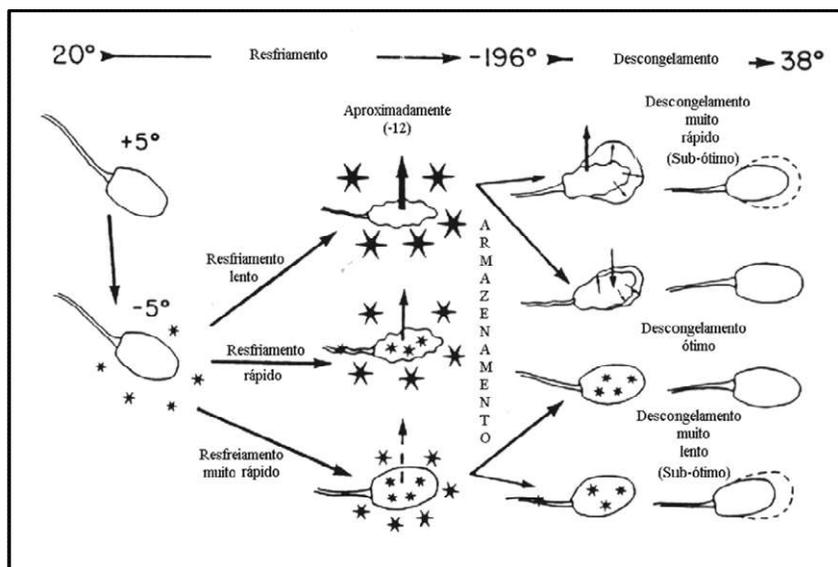
à taxa da queda de temperatura que o espermatozoide sofre durante o processo de resfriamento. Uma curva de resfriamento rápido imposta ao sêmen é responsável pela maioria das lesões celulares, em decorrência de alteração da propriedade física da membrana espermática (FÜRST, 2006).

A velocidade de redução da temperatura durante o resfriamento tem sido um dos fatores mais importantes no processo de criopreservação, visto que o grau de lesões celulares depende da curva de resfriamento. (FÜRST et al., 2005).

Quando as células são congeladas, elas estão sujeitas a estresses resultantes de interações água-soluto que aumentam com a cristalização do gelo. A descongelação envolve o contrário destes efeitos, e o conseqüente influxo de água pode causar ruptura membrana celular (AMANN; PICKETT, 1987; HOLT, 2000).

As mudanças físicas que ocorrem na célula durante o processo de congelação estão esquematizadas a seguir (Figura 3). Quando uma solução com crioprotetor chega à temperatura entre cinco graus negativos e 15 graus negativos, ela entra na zona de formação de cristais de gelo, levando à formação de cristais no diluidor, o que resulta em um aumento da concentração de soluto extracelular. Esta alta concentração faz a água intracelular mover para o meio extracelular, provocando a desidratação da célula. Existem alguns tipos de curva de congelação, entre elas a curva de congelação lenta, em que ocorre a desidratação completa do espermatozoide, impedindo, assim, a formação de cristais de gelo intracelular, porém altas concentrações de soluto podem gerar lesões nas células. A curva de congelação rápida evita que ocorra uma desidratação correta da célula, formando, assim, cristais de gelo intracelular, sendo prejudicial à célula (OLIVEIRA et al., 2013).

**Figura 3.** Supostas alterações no espermatozoide durante o congelamento e descongelamento

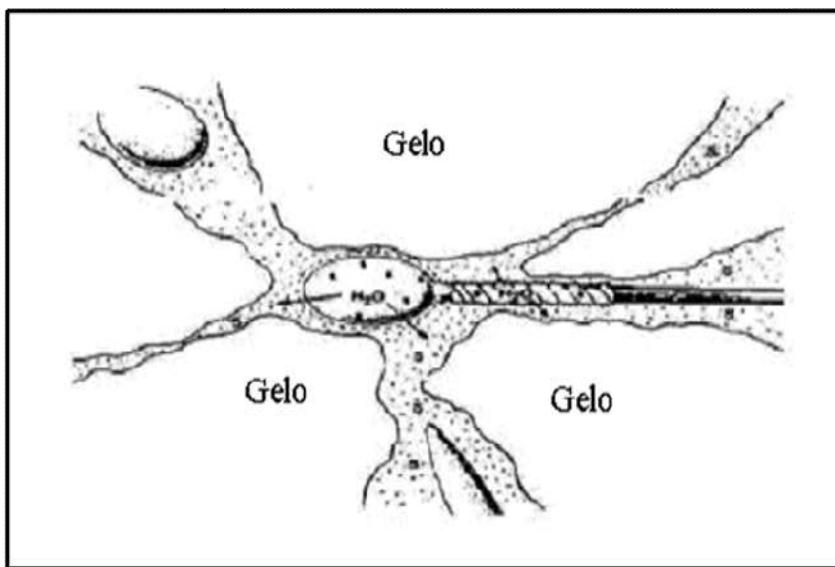


Fonte: Adaptado de Hammerstedt, et al., 1990.

Os princípios biofísicos que aplicam à criopreservação de células e tecidos vivos aplicam-se também à criopreservação da célula espermática. Os espermatozoides podem sofrer danos durante a criopreservação e/ou descongelamento, seja pela formação de grandes cristais de gelo intracelulares como pela concentração intracelular de solutos e modificações correlacionadas, que resultam na desidratação das células durante a criopreservação (efeito de solução); este fenômeno inclui os seguintes efeitos: de desidratação excessiva; elevada concentração de solutos, solução tóxica à célula; e mudança de pH celular, alterando o metabolismo celular. Enquanto que a congelação rápida minimiza os danos dos efeitos de solução, leva a formação de grandes cristais de gelo, que causam graves danos mecânicos. Por outro lado, enquanto a congelação lenta impede a formação de grandes cristais, ela eleva os danos dos efeitos de solução. Por isso, os índices ótimos de congelação do sêmen dependem de sua tolerância relativa aos danos dos cristais de gelo formados e à toxicidade dos efeitos de solução (WATSON, 1995; NEVES, 1998; FÜRST, 2006). Sempre que preconizada uma curva de congelação, será escolhida uma curva de descongelamento subsequentemente. Caso o sêmen seja congelado por meio de uma curva de congelação lenta, deverá ser descongelado da mesma forma, para que haja tempo de o espermatozoide se reidratar. Porém, se for utilizada uma curva de congelação rápida, a descongelamento deverá ser rápida, evitando o fenômeno da recristalização (OLIVEIRA et al., 2013).

A adição de crioprotetores, como o glicerol, possibilita a congelação de espermatozoides a temperaturas mais baixas. Isto provavelmente retarda a desidratação das células e os fatores deletérios dos efeitos de solução; assim, os espermatozoides podem ser resfriados lentamente o suficiente para prevenir a formação de grandes cristais de gelo. Evitam-se, assim, os efeitos prejudiciais dos cristais de gelo intracelulares que são causados ou pela sua expansão e recristalização durante a descongelação, ou pelo impacto osmótico sobre as células, quando os cristais intracelulares derretem (NEVES, 1998). Os crioprotetores penetrantes, que têm propriedade solvente, possuem o ponto de congelação muito mais baixo que o da água. Com a congelação do diluidor de sêmen, a água pura congela primeiro e forma cristais de gelo e, entre estes cristais de gelo, ficam canais de diluidor não congelado, onde o espermatozoide fica alojado (Figura 4).

**Figura 4.** Canais não congelados



Fonte: Oliveira, 2002.

Com a água congelada, aumenta a concentração de soluto o que aumenta a osmolaridade do meio extracelular e promove o egresso de água da célula, conseqüentemente, o espermatozoide irá se desidratar, diminuindo seu volume, pois água passa mais rapidamente através da membrana do que o crioprotetor penetrante. Este processo evita o acúmulo de água e a formação de cristais de gelo intracelular. Esta mudança dura até que o crioprotetor penetrante entre na célula em quantidades suficientes para restaurar o volume celular inicial (GRAHAM, 1993; WATSON, 1995; HOLT, 2000; CELEGHINI, 2005).

A curva de congelamento é de extrema importância na manutenção da integridade celular. Quando a taxa é adequada, a célula torna-se progressivamente desidratada e permanece funcional após o descongelamento. Caso contrário ocorre perda da viabilidade das células, possivelmente em função da diminuição do conteúdo de água intracelular, ocasionando aumento das concentrações de solutos intracelulares e precipitação destes, com alteração do pH e osmolaridade do meio (WATSON, 1995).

Quando a congelação é realizada com curva muito rápida, não há tempo suficiente para que ocorra adequada desidratação, resultando na formação de grandes cristais de gelo no meio intracelular. Para o descongelamento, necessita-se de uma velocidade rápida, para que não ocorra a recristalização (fusão de cristais de gelo) e, conseqüentemente, lesão celular. Da mesma forma, o congelamento lento exige um descongelamento lento. Neste caso, a desidratação celular é maior e necessita de um tempo maior para que ocorra a re-hidratação espermiática, para que a célula não perca a sua viabilidade morfofuncional. No sêmen descongelado rapidamente, o gelo derrete depressa e dilui o soluto do meio, permitindo a água entrar muito rapidamente no espermatozoide, o qual se encontra altamente concentrado, danificando o espermatozoide (FÜRST, 2006).

### 3.2.1 Meios de congelação de sêmen

Quando as células espermiáticas são resfriadas ou criopreservadas na tentativa de prolongar sua vida útil e facilitar o transporte até a égua, seu ciclo fisiológico é interrompido. Para que a preservação do sêmen pela criopreservação tenha sucesso, é necessário que o espermatozoide seja colocado em um ambiente apropriado, ou seja, em um diluidor. (NEVES, 1998). Por essa razão, torna-se necessário o uso de diluidores que devem atender aos seguintes requisitos: ter capacidade tampão; proteger contra o choque térmico; proporcionar uma fonte de energia; ter capacidade antibacteriana (PIMENTEL; CARNEIRO, 2008).

A definição de um “meio de congelação ideal” é variável, devendo-se levar em consideração variáveis individuais dos ganhões quanto à congelabilidade do sêmen com determinado tipo de diluente, o método de congelação e o envase, assim como a análise do sêmen pós-descongelação (SQUIRES et al., 1999).

Os crioprotetores são compostos acrescentados ao meio de congelação de sêmen, com a finalidade de proteger os espermatozoides durante o processo de congelação (PALMER, 1984). Esses compostos em concentrações elevadas podem provocar danos aos

espermatozoides, pela toxicidade e pelo aumento da osmolaridade da membrana plasmática (SQUIRES et al., 2004).

### 3.2.2 Crioprotetores

Os crioprotetores podem ser classificados como penetrantes e não penetrantes, de acordo com sua capacidade em atravessar a membrana plasmática (MP) (CELEGHINI, 2005).

Os crioprotetores não penetrantes são grandes moléculas que não atravessam a MP (COTTORRELLLO; HENRY, 2002). Incluem-se nesta categoria, gema de ovo, proteína do leite, açúcares, dentre outros. Esta categoria protege as células basicamente através de efeitos osmóticos (OLIVEIRA, 2002), exercem seus efeitos benéficos pela alteração das propriedades de fase de transição das membranas (AMANN; PICKETT, 1987).

Os crioprotetores penetrantes atravessam a MP do espermatozoide e atuam no meio intracelular e extracelular. Incluem pequenas moléculas como o glicerol, dimetilsulfóxido, amidas e outras (COTTORRELLLO; HENRY, 2002). Os crioprotetores atuam na proteção das estruturas celulares, aumentando o número de canais de solventes que permanecem não-congelados e diluindo as altas concentrações de sais, diminuindo o efeito-solução sobre as células (GRAHAM, 1993), ligando-se fortemente aos íons de hidrogênio na molécula de água, tornando, assim, mais lenta a desidratação celular durante a congelação. Foi sugerido que o crioprotetor ideal deve ter baixo peso molecular, grande solubilidade na água e mínima toxicidade (COTTORRELLLO; HENRY, 2002).

Os primeiros meios de congelação de sêmen equino apresentavam em sua composição básica os componentes glicose, lactose e gema de ovo, sem a presença de um agente crioprotetor (SQUIRES et al., 1999).

Desde a descoberta das propriedades crioprotetoras do glicerol (G), este tem sido o principal crioprotetor usado para congelar o sêmen de garanhões (ROYERE et al., 1996; SQUIRES et al., 1999). O glicerol possui alto peso molecular e viscosidade, tendo a capacidade de difundir-se lentamente através da membrana plasmática, diminuindo a temperatura do ponto de congelação (HOLT, 2000) e a concentração de sais e solutos intracelulares (SQUIRES et al., 2004).

O G pode ser prejudicial ao espermatozoide durante o processo de descongelação, mais do que durante a criopreservação. É provável que durante o resfriamento haja o movimento do G para dentro do espermatozoide, e no descongelamento, ele se move de dentro da célula para o meio extracelular (AMANN; PICKETT, 1987).

A toxicidade do G é parcialmente devida ao estresse osmótico, por que o G permeia nas membranas celulares mais lentamente que os outros crioprotetores (ALVARENGA et al., 2005).

O crioprotetor mais utilizado na espécie equina é o glicerol, apesar do grau de toxicidade que oferece à célula, no entanto, estudos comprovam que não foram encontrados crioprotetores mais eficientes que o glicerol na crioproteção. Esse crioprotetor provoca estresse osmótico, mudanças na organização, na fluidez e na permeabilidade da membrana e mudanças em sua composição lipídica. Alguns estudos usam níveis de 7% de glicerol como ótima concentração para diluidores à base de gema de ovo em métodos convencionais de congelação (OLIVEIRA et al., 2013). As concentrações usuais de glicerol, de 5 a 7% são utilizadas para obtenção de índices ideais de criopreservação para o sêmen ovino (SILVA E GUERRA, 2011).

Na última década, o uso de formamidas (dimetilformamida e metilformamida) como crioprotetores determinou novas modificações aos meios de congelação, como o uso associado das formamidas ao glicerol (PAPA et al., 2002).

O dimetilsulfóxido (DMSO), composto químico orgânico, apresenta toxicidade baixa. Sua principal ação deve-se à sua capacidade de interagir com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração molecular, devido a sua rápida penetração celular (DE SANTIS; PRATA, 2009).

O mecanismo de ação do DMSO na célula espermática ainda não está totalmente elucidado, porém sabe-se que ele interage com os fosfolipídeos estruturais da membrana espermática, mantendo a propriedade de transporte de água em temperaturas abaixo do 0°C, reduzindo a formação de cristais de gelo, por diminuir o ponto de congelamento do fluido intracelular durante o processo de criopreservação (SILVA; GUERRA, 2011). Estudos demonstraram o DMSO foi eficaz na criopreservação de espermatozoides bovinos (DE SANTIS; PRATA, 2009).

No entanto, poucos trabalhos usam a adição apenas de DMSO na criopreservação de espécies mamíferas. Há relatos de associação entre o glicerol e o DMSO para a espécie caprina, com resultados positivos. Desta forma, embora muitos estudos tenham sido realizados com diferentes crioprotetores penetrantes objetivando a substituição do glicerol, este ainda é o crioprotetor mais utilizado em pesquisas e trabalhos de campo para criopreservação de células espermáticas nas espécies domésticas (SILVA; GUERRA, 2011).

### 3.2.3 Meios de centrifugação de sêmen

#### 3.2.3.1 Centrifugação em Camada Única

Um novo método de centrifugação tem sido usado para melhorar a qualidade do sêmen de garanhões. Essa centrifugação é feita depositando o sêmen em uma única camada de sílica coloidal, com uma formulação específica da espécie Equina (AndroColl® Equine). Esse método de centrifugação é conhecido como centrifugação em camada única (Single Layer Centrifugation - SLC) (MORREL et al., 2013).

Segundo Morrel (2011) e Morrel e Rodriguez-Martinez (2010), as principais aplicações da seleção de espermatozoides pelo método da SLC são: melhorar a qualidade espermática nas doses de IA, especialmente para garanhões "problema"; aumentar o "tempo de bancada" de amostras espermáticas normais quer pelo tratamento do sêmen fresco antes da preparação das doses de IA ou por tratamento do sêmen da dose armazenada para extrair os melhores espermatozoides; melhorar o problema de espermatozoides que não toleram o resfriamento até 4-6 ° C; melhorar a sobrevivência pós criopreservação através da remoção de espermatozoides mortos e lentos antes da criopreservação ou seleção de espermatozoides vivos pós-descongelamento; selecionar espermatozoides morfolologicamente normais com cromatina intacta a partir de sêmen de garanhões subfêrteis para ICSI, aumentando assim o número de blastocistos; remover organismos patogênicos (vírus, bactérias); acelerar o processo de seleção sexual na citometria de fluxo, removendo os espermatozoides mortos e lentos antes da passagem através do feixe de laser; preservar raças raras.

De acordo com Macías García et al. (2009), estudos mostraram que no sêmen não-centrifugado (controle), a sub-população predominante era de células com baixa velocidade, após SLC, a sub-população dominante passou a ser de células com alta velocidade. Outros parâmetros de qualidade do sêmen como motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática, também melhoraram após a SLC. O método SLC é prático e de fácil execução, visando melhorar a qualidade das amostras de sêmen equino descongeladas.

Segundo Morrel e Rodriguez-Martinez (2009), a SLC seleciona espermatozoides com boa motilidade, morfologia normal, as membranas intactas e boa integridade da cromatina. Morrel et al. (2013) afirmam que o coloide AndroColl® Equine (AndroColl-E) mostrou ser eficaz na seleção de espermatozoides móveis com morfologia normal de ejaculados de garanhões subfêrteis.

### 3.3 Análises espermáticas computadorizadas

Apesar das análises rotineiras como, volume, motilidade espermática, morfologia, serem importantes, não fornecem um diagnóstico seguro, pois os indivíduos podem apresentar baixa fertilidade ou serem inférteis, mesmo possuindo parâmetros seminais normais (SILVA; GUERRA, 2012).

O indicador mais utilizado de qualidade espermática em garanhões é a motilidade espermática subjetiva. Porém, esse indicador tem provado ser um fraco indicador de fertilidade. Na maioria dos estudos, não foi possível correlacionar a motilidade dos espermatozoides com a fertilidade campo (MACÍAS GARCÍA et al., 2009).

Por enquanto, nenhum teste laboratorial isolado é capaz de determinar o potencial de fertilidade dos espermatozoides, por isso várias técnicas são utilizadas para a avaliação de diferentes características espermáticas (SILVA; GUERRA, 2012)

Atualmente existem técnicas laboratoriais precisas e modernas que auxiliam no conhecimento da célula espermática, como sistema computadorizado CASA, que apresenta dados de cinética espermática não mensurável ao olho humano (NASCIMENTO, 2006).

Apesar destas informações sobre a cinética espermática serem muito importantes, nem sempre podem ser utilizadas para avaliar o potencial de fertilidade do sêmen. Acredita-se que a integridade das membranas espermáticas seja crucial para a fertilização. Por este razão, grande ênfase vem sendo dada ao uso das sondas fluorescentes, uma técnica de grande valor laboratorial por sua característica de marcar estruturas específicas das células e detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara, sendo possível avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal (GRONDAHL et al., 1994).

O uso das sondas fluorescentes associado ao citômetro de fluxo possui uma maior rapidez e acurácia para mensurar parâmetros espermáticos em larga escala (BATISTA; GUERRA, 2010).

#### 3.3.1 Análise da cinética espermática

Na análise de cinética espermática realizada pelo sistema computadorizado CASA, de acordo com Verstegen et al. (2002), são consideradas as seguintes variáveis: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ) velocidade curvilinear (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu\text{m}$ ), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e

espermatozoides rápidos (RAP, %); Frequência de Batimentos (BCF, Hz) e índice de oscilação ou wobble (WOB, %).

Dentre os índices fornecidos pelo CASA, a velocidade primária (VCL) e as velocidades calculadas (VSL e VAP) são os mais confiáveis da qualidade espermática em estudos com humanos e animais (RODRIGUEZ MARTINEZ et al., 2008) e são considerados como sendo altamente correlacionada com a fertilidade à campo (OLDS-CLARKE, 1996; HOLT et al., 1997; DE GEYTER et al., 1998, PINHEIRO NETO, 2015).

Apesar das inúmeras variáveis fornecidas pelo sistema CASA, Budworth et al. (1897, 1988) observaram uma correlação significante entre motilidade e velocidade do espermatozoides com o índice de fertilidade.

Olds-Clarke (1996), em estudos com ratos, demonstrou que o VCL elevado é essencial para penetração do espermatozoide na junção útero-tubárica, para a formação do reservatório de espermatozoides e para a penetração na zona pelúcida.

No entanto, para uma melhor migração e penetração no muco cervical, amostras com valores elevados dos parâmetros de velocidade, LIN e BFC foram mais eficientes (VERSTEGEN et al., 2002).

Silva et al. (2006), em estudos com caninos, Holt et al. (1997), em suínos, relataram que a fertilidade tanto *in vivo* como *in vitro* é dada por altas velocidades de espermatozoides.

Hirano et al. (2001) demonstraram que ambos os índices, VCL e VSL, tiveram correlação positiva com as taxas de fertilização *in vitro* em humanos.

### 3.3.2 Análise de integridade de membrana

Para avaliação da integridade dessas membranas, várias metodologias têm sido desenvolvidas, dentre as quais se destacam as análises fluorescentes e as análises computadorizadas (ARRUDA et al., 2007). A função desses testes é avaliar a capacidade fecundante do espermatozoide, visando preservar características fundamentais da célula espermática, como: enzimas localizadas no acrossoma, essenciais para penetração no oócito e proteínas presentes na MP (FÜRST, 2006).

A integridade de membrana é normalmente avaliada após o contato dos espermatozoides a corantes impermeáveis à membrana, assim, os gametas não corados são considerados vivos. Atualmente muitos corantes usados são fluoróforos que reagem com enzimas citoplasmáticas ou ligam-se ao DNA (BATISTA; GUERRA, 2010), refletindo o real

estado das estruturas celulares (CELEGHINI et al., 2007a) e a possibilidade de utilização isoladamente ou em combinação, para a determinação da integridade e da viabilidade celular (SILVA; GUERRA, 2012).

De acordo com Batista; Guerra (2010), a integridade acrossomal pode ser mensurada por diferentes métodos, todavia os mais comumente usados são aqueles que utilizam isotiocianato de fluoresceínas conjugadas a lectinas, tais como: *Peanut Agglutinin* (FITC-PNA).

Os sistemas de análises computadorizadas de imagens fornecem alta repetibilidade dos resultados e são mais precisos, acurados, rápidos e objetivos, com o uso da citometria de fluxo, que pode ser usada em associação aos fluorocromos, permitindo a avaliação de milhares de células por segundo (ARRUDA et al., 2007; SILVA; GUERRA, 2012).

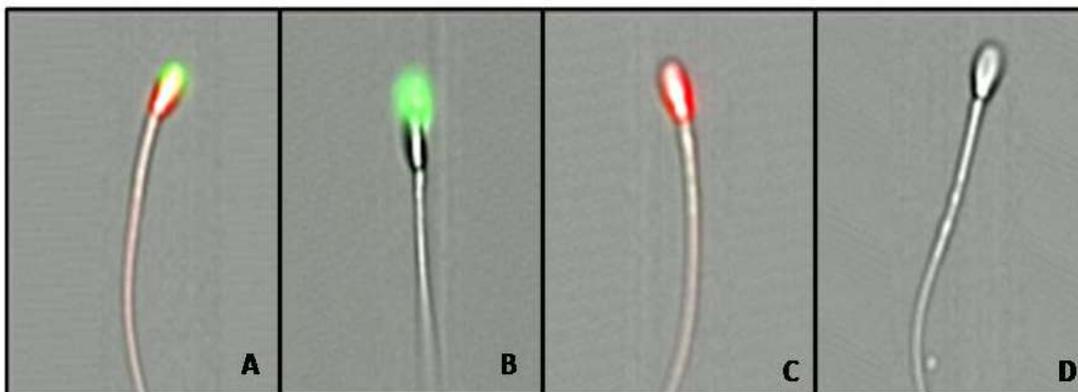
A possibilidade de se associar sondas fluorescentes para a avaliação simultânea das membranas plasmática e acrossomal em espermatozoides é muito utilizada por vários autores (CELEGHINE, 2005).

A análise de integridade de acrossoma (Figura 5) pode ser avaliada de acordo com a técnica de coloração FITC-PNA, a *Peanut agglutinin* (PNA) conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ROTH et al., 1998), classificados em: a) acrossomas intactos (AI), quando apresentarem-se corados em verde; b) acrossomas reagidos (AR), quando apresentarem-se corados em verde mesclado; c) sem coloração ou apenas uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática.

A análise de integridade de membrana plasmática (Figura 5) pode ser realizada pelo corante Iodeto de Propídio (IP), segundo Coletto et al. (2002), modificado. Esta sonda cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003a; NASCIMENTO, 2006).

O número de espermatozoides viáveis na análise de integridade de MP correlaciona-se positivamente com a fertilidade, sendo a variável de maior impacto na predição da fertilidade seminal (JANUSKAUSKAS et al., 2003; PINHEIRO NETO, 2015).

**Figura 5.** Imagem feita por Citometria de Fluxo das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI e FITC-PNA



PI + (positivo): núcleo corado de vermelho, FITC-PNA + (positivo): acrossomo corado de verde. **A-** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado (IP+, FITC-PNA+), **B-** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo lesado (IP-, FITC-PNA+), **C-** Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto (IP+, FITC-PNA-), **D-** Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto (IP-, FITC-PNA-).

#### 4 REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen:review. **Animal Reproduction Science**, v.5, p.2, 2005.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of criopreservação and a review of criopreservação of stallion semen. **Journal of Equine Veterinary**, v.7, p.145-173, 1987.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. Tese de Livre Docência, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2000. 121 p.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 226-227, 2003a.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 8-16, 2007.

BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. Novas técnicas para avaliação da qualidade do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.3, p.125-132, 2010.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.; LIU, I.K.M.; DROBNIS, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v.14, n.4, p.289-297, 1993.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatinados espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**, 2005. 186p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479-488, 2007.

COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 24, p. 101-104, 2002.

COTTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. Princípios da Criopreservação, congelação e avaliação do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.1, p. 14-25, 2002.

DE GEYTER, C.H.; DE GEYTER, M.; KOPPERS, B.; NIESCHLAG, E. Diagnostic accuracy of computer assisted sperm motion analysis. **Human Reproduction**, 13, 2512-2520, 1998.

DE SANTIS, G.C.; PRATA, K.L. Criopreservação de células progenitoras hematopoéticas. **Revista de Medicina da USP de Ribeirão Preto**, v.42, n.1, p.36-47, 2009.

FÜRST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen eqüino**. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M.; STOUT, T.A.E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. . **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249-265, 2001.

GOULART, H.M.; SILVA, A.E.D.F.; MCMANUS, C.; PAPA, F.O. Efeitos da Pentoxifilina sobre a viabilidade in Vitro dos Espermatozoides de Equinos, após o Resfriamento a 5°C. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.1, p.112-122, 2004.

GRONDAHL, C.; GRONDAHL, M.L.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Acrosomal status in fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy. **Anatomy and Embryology**, Berlim, v.190, n.2, p. 195-200, 1994.

GRAHAM, K.J. Response of spermatozoa to freezing. **Journal of Andrology**, V.14, p.83-104, 1993.

HAMMERSTEDT, H.R.; GRAHAM, K.J.; NOLAN, P.J.; Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, V.11, n.1, 1990.

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

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v.60, p.743-758, 2003.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinária**, v.10, p.156-165, 1994.

KEITH, S. L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa.** Colorado, 1998. 104 f. Thesis (Master of Science) – Colorado State University, Fort Collins.

MACÍAS GARCÍA, B.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MORRELL, J.M.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; TAPIA, J.A.; RODRIGUEZ MARTÍNEZ, H.; PENÃ, F.J. Single-Layer Centrifugation Through Colloid Positively Modifies the Sperm Subpopulation Structure of Frozen–Thawed Stallion Spermatozoa. **Reproduction Domestic Animals**, v.44, p.523–526, 2009.

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

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica.** 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

MORRELL, J.M. Biomimetics in Action: Practical Applications of Single Layer Centrifugation for equine breeding. **Veterinary Science and Technology**, v.2, 2 ed., p. 107, 2011.

MORRELL, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. **The Open Andrology Journal**, v.1, p.1-9, 2009.

MORRELL, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Practical Applications of Sperm Selection Techniques as a Tool for Improving Reproductive Efficiency. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p.9, 2010.

MORRELL, J.M.; TIMONEY, P.; KLEIN, C.; SHUCK, K.; CAMPOS, J.; TROEDSSON, M. Single-Layer Centrifugation Reduces Equine Arteritis Virus Titre in the Semen of Shedding Stallions. **Reproduction Domestic Animals**, v.48, p.604–612, 2013.

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial**

**de espermatozoides eqüinos criopreservados**, Pirassununga, 2006. 107p, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga.

NEVES, J.R.N. **Avaliação da congelabilidade e fertilidade do sêmen eqüino frente a diferentes diluidores**, Botucatu, 1998. 91p, Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

OLIVEIRA, J.V. **Congelação de Sêmen de Eqüídeos e Seu Uso: Limitações e Perspectivas**, Botucatu, 2002. 18p, Monografia (Pós-Graduação) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

OLIVEIRA, G.C.; OLIVEIRA, B.M.M.; CELEGHINI, E.C.C.; FERNANDES, C.B.; MATTOS, C.B. **Criopreservação do sêmen eqüino: uma revisão**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, 2013.

OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability. **Journal of Andrology**, v.17, 183–186, 1996.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL’AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen eqüino. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 184-187, 2002.

PIMENTEL, C. A.; CARNEIRO, G. F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução de Equinos, **In: Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREIDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 8, p. 145-159.

PINHEIRO NETO, F.S.A. **Avaliação da IATF em novilhas girolando utilizando-se diferentes protocolos com sêmen sexado**, 2015. 54p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns.

ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L.; 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 Reproduction, Champaign**, v.58, p.475-482, 1998.

ROYERE, D.; BARTHELEMY, HAMAMAH, S.; LANSAC, J. Cryopreservation of spermatozoa: a 1996 review. **Human Reproduction Update**, v.2, n.6, p.553-559, 1996.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, Stoneham, v.65, p.958-978, 2006.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370-384, 2011.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉ, V.H.; LOPES, M.D.; SOUZA, F.F., 2006: Prognostic value of canine frozen thawed semen parameters on in vitro sperm–oocyte interactions. **Theriogenology** 66, 456–462.

SILVA, E.C.B; GUERRA, M.M.P. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.11, n.2, p.162-169, 2012.

SCHEMBRI, M.A.; MAJOR, D.A.; SUTTIE, J.J.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. **Reproduction, Fertility and Development Journal**, v.14,p. 225-233, 2002.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. **Cooled and frozen stallion semen**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Bulletin n. 9, 1999.

SQUIRES, E.L., LINDSEY, A.C., BUCHANAN, B.R. A method to obtain pregnancies in mares using minimal sperm numbers. In: American Association of Equine Practitioners, 46, 2000, San Antonio, **Proceedings...**p.335.2000.

VERSTEGEN J, IGUER-OUADA M, ONCLIN K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

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

ZAHN, F.S. **Avaliação dos constituintes bioquímicos e protéicos do plasma seminal e do soro sanguíneo e das proteínas de membrana plasmática e sua correlação com a qualidade do sêmen congelado em garanhões**, 2006. 121p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

### **Efeitos do colóide de centrifugação em camada única e de diferentes diluentes de congelamento na qualidade do sêmen equino**

*Effects of colloid in a single layer centrifugation and different freezing extenders on equine sperm quality*

**A.B. Finazzi<sup>1\*</sup>, G.F. Carneiro<sup>1</sup>, M.M. Nunes<sup>3</sup>, A.M. Batista<sup>2</sup>, B.B. Santana<sup>1</sup>, L.C.P. Arruda<sup>2</sup>, M.M.P. Guerra<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco - LABRAPE, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Andrologia - ANDROLAB, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup>MINITUBE, Porto Alegre, RS, Brasil.

\* Autor para correspondência: amandafinazzi@bol.com.br.

### **Resumo**

Objetivou-se avaliar o efeito da centrifugação em coloide de camada única (AndroColl<sup>®</sup>-E; Minitub, Alemanha) e três diluentes de congelamento: diluente 1 (Botucurio<sup>®</sup>; Biotech, Botucatu, Brasil), diluente 2 (EquiPlus Freeze<sup>®</sup>; Minitub, Alemanha + 3% glicerol) e diluente 3 (EquiPlus Freeze<sup>®</sup>; Minitub, Alemanha + 3% DMSO), sobre a qualidade do sêmen equino. Utilizou-se 3 ejaculados de 5 garanhões (n=15), colhidos por vagina artificial. Após a colheita, o sêmen foi diluído com meio à base de leite desnatado (EquiPlus<sup>®</sup>, Minitub, Alemanha) e dividido em 2 grupos: grupo E (centrifugado sem coloide) e grupo A (centrifugado com coloide). No grupo E, o sêmen foi centrifugado à 676g por 15 minutos, no

27 grupo A, o sêmen foi centrifugado à 314g por 20 minutos. Após a centrifugação, os grupos  
28 receberam os diferentes diluentes: diluente 1, diluente 2 e diluente 3. Logo após foram  
29 levadas ao congelamento em máquina programável portátil e armazenadas em botijões  
30 criogênicos. A cinética foi avaliada pelo CASA e a integridade das membranas plasmática e  
31 acrossomal, por associação de sondas fluorescentes submetidas ao Citômetro de Fluxo. Com  
32 relação aos parâmetros do CASA, pode-se observar que o grupo A1, centrifugado com o  
33 coloide, teve resultado superior nas variáveis LIN e WOB, comparadas com o grupo E1. Já as  
34 variáveis, RAP, VCL, VAP, ALH e BCF, tiveram resultados inferiores quando centrifugadas  
35 com o colóide, grupo A1 em relação ao grupo E1. Com relação à integridade de membrana  
36 plasmática e acrossomal, pode-se observar que os grupos A1 e A3, que foram centrifugados  
37 com o coloide, tiveram resultado superior aos grupos E1 e E3, que foram centrifugados sem o  
38 coloide. O uso do coloide melhorou integridade das membranas plasmática e acrossomal,  
39 provavelmente evitou o processo da hiperativação espermática e proporcionou menor  
40 produção de ROS. Maiores estudos *in vivo* serão necessários para comprovação desta técnica.

41

42 **Palavras-chave:** criopreservação, reprodução equina, sondas fluorescentes, CASA,  
43 Citometria de Fluxo.

44

45

#### Abstract

46 This study aimed to evaluate the effect of a colloid in single layer centrifugation  
47 (AndroColl®-E; Minitub, Germany) associated to three freezing extenders: extender 1  
48 (Botucurio®; Biotech, Botucatu,, Brazil), extender 2 (EquiPlus Freeze®; Minitub, Germany +  
49 3% glycerol) and extender 3 (EquiPlus Freeze®; Minitub, Germany + 3% DMSO) on equine  
50 semen quality. We used three ejaculates from five stallion (n=15), collected by artificial  
51 vagina. After collection, the semen was diluted with extender to from skimmed milk

52 (EquiPlus®, Minitub, Germany) and divided into 2 groups: group E (centrifuged without  
53 colloid) and group A (centrifuged with colloid). No grupo E, o sêmen foi centrifugado à 676g  
54 por 15 minutos, no grupo A, o sêmen foi centrifugado à 314g por 20 minutos. Após a  
55 centrifugação, os grupos receberam os diferentes diluentes: diluente 1, diluente 2 e diluente 3.  
56 The kinetics was evaluated by CASA and the integrity of plasma and acrossomal membrane  
57 by association of fluorescent probes and subjected to flow cytometry. With respect to the  
58 CASA parameters, it can be seen that the A1 group, with the colloid centrifuged, had superior  
59 result in LIN and WOB variables, compared to the E1 group. The variables, RAP, VCL,  
60 VAP, ALH and BCF, had lower results when centrifuged with colloid, A1 group than in the  
61 group E1. With respect to the integrity of plasma and acrosomal membrane, it can be seen that  
62 A1 and A3 groups were centrifuged with colloid, they had superior result to E1 and E3  
63 groups, which were centrifuged without the colloid. The use of colloid improved integrity of  
64 plasma and acrosomal membranes probably avoided the process of sperm hyperactivation and  
65 provided lower production of ROS. Greater *in vivo* studies are needed to prove this technique.

66

67 **Keywords:** cryopreservation, equine reproduction, fluorescent probes, CASA, Flow  
68 Cytometry.

69

70

## Introdução

71 A inseminação artificial é a biotecnia da reprodução mais importante e mais utilizada  
72 para melhoramento genético animal, teve início em 1957 com a primeira gestação equina  
73 gerada por espermatozóides criopreservados (OLIVEIRA et al., 2013). A inseminação  
74 artificial associada a criopreservação do sêmen maximizam o potencial genético do  
75 reprodutor, permitindo o maior número de descendentes de animais de alto mérito genético;  
76 melhoria do controle de doenças sexualmente transmissíveis (FÜRST et al., 2012); redução de

77 custos e estresse do transporte; utilização do sêmen de garanhões em competição ou se  
78 recuperando de alguma afecção e armazenamento e possibilidade de uso do sêmen mesmo  
79 após a morte do garanhão (PIMENTEL; CARNEIRO, 2008).

80 O uso do sêmen congelado equino ainda é restrito na rotina do campo, pois essa  
81 biotecnologia necessita de controle rigoroso da atividade ovariana, indução da ovulação,  
82 inseminação realizada no momento mais próximo possível da ovulação e ainda apresenta  
83 índices reprodutivos menores que os resultados obtidos com uso do sêmen fresco ou resfriado  
84 (SQUIRES et al., 2000).

85 Após vários estudos, sabe-se que grande parte dos garanhões possui características  
86 peculiares de sêmen pós-descongelamento (motilidade espermática e integridade de membrana  
87 celular) que podem ser inadequadas para o seu uso (SQUIRES et al, 1999), havendo até  
88 denominação: “bad freezers” e “good freezers”, para animais que congelam mal e bem,  
89 respectivamente. Isso se deve ao fato da espécie equina ter sido selecionada por fenótipo e  
90 desempenho, e a fertilidade do garanhão, normalmente é ignorada nos programas de  
91 melhoramento genético (MACÍAS GARCÍA et al., 2009).

92 O processo de criopreservação causa danos à integridade estrutural, bioquímica e  
93 biofísica da membrana plasmática (MP) do espermatozoide, resultando em menor fertilidade  
94 do sêmen após a descongelamento, pois ocorre uma perda de aproximadamente 50% dos  
95 espermatozoides (FÜRST et al., 2012).

96 Vários protocolos são desenvolvidos e testados na tentativa de maximizar a utilização  
97 do sêmen equino congelado, procurando minimizar os danos causados pelo processo de  
98 criopreservação, melhorando assim as taxas de fertilidade.

99 Apesar de o glicerol ser o crioprotetor mais utilizado, recentes pesquisas, utilizaram  
100 crioprotetores alternativos como o etilenoglicol, metilformamida, dimetilformamida e

101 dimetilsulfóxido, e obtiveram resultados similares ou superiores ao glicerol (ALVARENGA  
102 et al., 2005).

103 Um método de centrifugação conhecido como centrifugação em camada única (Single  
104 Layer Centrifugation - SLC) tem sido usado para melhorar a qualidade do sêmen de  
105 garanhões. Essa centrifugação é feita depositando o sêmen em uma única camada de sílica  
106 coloidal, com uma formulação específica da espécie Equina (AndroColl® Equine).  
107 (MORREL et al., 2013). Segundo Morrel e Rodriguez-Martinez (2009), a SLC seleciona  
108 espermatozoides com boa motilidade, morfologia normal, as membranas intactas e boa  
109 integridade da cromatina.

110 Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da centrifugação em coloide de camada  
111 única: AndroColl® Equine e três diluentes de congelamento: Botucrio®, EquiPlus Freeze® +  
112 3% glicerol e EquiPlus Freeze® + 3% DMSO sobre a qualidade do sêmen equino e relacionar  
113 seus efeitos sobre os parâmetros da cinética espermática e sobre a integridade da membrana  
114 plasmática e acrossomal.

115

## 116 **Material e métodos**

117 Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados após aprovação pela  
118 Comissão de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal Rural de  
119 Pernambuco (UFRPE), licença nº 057/2015 CEUA/UFRPE.

120

### 121 *Desenho Experimental*

122 Foram utilizados 5 garanhões da raça Quarto de Milha, com idade entre 7 e 20 anos,  
123 sob regime regular de colheita de sêmen, todos mantidos em um mesmo manejo, pertencentes  
124 ao Haras Monte Verde, localizado no município de Sairé, PE, Brasil (8°19'42"S e  
125 35°41'23"W).

126 Após exame clínico-andrológico, foram colhidos 3 ejaculados de cada garanhão  
127 (n=15) por meio da utilização de vagina artificial (modelo Botucatu) e auxílio de fêmea como  
128 manequim. Imediatamente após a colheita, a fração gel foi separada e desprezada. As  
129 amostras foram submetidas à avaliação subjetiva em microscópio óptico com contraste de  
130 fase (Olympus, Tokyo, Japan; 100 x) para motilidade e vigor. Foram utilizadas as amostras  
131 que se apresentaram dentro dos padrões mínimos recomendados pelo CBRA (2013) para o  
132 sêmen equino (motilidade  $\geq 60\%$  e vigor  $\geq 3$ ).

133 A concentração espermática foi determinada utilizando Câmara de Neubauer. O sêmen  
134 foi diluído em meio à base de leite desnatado e a concentração mantida em 100 a 150 x 10<sup>6</sup>  
135 espermatozoides/mL.

136 Posteriormente, o sêmen foi dividido em dois grupos, Grupo E (centrifugado sem  
137 colóide) e Grupo A (centrifugado com colóide). No Grupo E, o sêmen foi subdividido em 3  
138 tubos Falcon de 60 mL e centrifugados à 676g por 15 minutos. Após a centrifugação, o  
139 sobrenadante foi desprezado e cada um dos tubos receberam um diluente diferente: Diluente 1  
140 (Botucrio<sup>®</sup>; Botupharma), Diluente 2 (EquiPlus Freeze<sup>®</sup>; Minitub + 3% glicerol) e Diluente 3  
141 (EquiPlus Freeze<sup>®</sup>; Minitub + 3% DMSO). No Grupo A, 15 mL do coloide foram  
142 acrescentados em 3 tubos Falcon de 60 mL. Em cada tubo, 15 mL do sêmen diluído foi  
143 depositado lentamente sobre o colóide, com o auxílio de uma pipeta. Para deposição do sêmen  
144 sobre o coloide, o tubo foi mantido num ângulo de aproximadamente 45°. Após a correta  
145 deposição, pode-se observar uma interface definida entre as soluções. As amostras foram  
146 centrifugadas à 314g por 20 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi aspirado com  
147 o auxílio de uma pipeta e desprezado, e em seguida, cada um dos tubos recebeu um diluente  
148 diferente: Diluente 1 (Botucrio<sup>®</sup>; Biotech Ltda/ME, Botucatu, Brasil), Diluente 2 (EquiPlus  
149 Freeze<sup>®</sup>; Minitub + 3% glicerol) e Diluente 3 (EquiPlus Freeze<sup>®</sup>; Minitub + 3% DMSO).

150 A concentração foi mantida em  $10 \times 10^6$  espermatozoides por mL, envasadas em  
151 palhetas de 0,5 mL e lacradas com álcool polivinílico, que foram levadas ao congelamento em  
152 máquina programável portátil (TK3000<sup>®</sup>, TK Tecnologia em Congelamento LTDA, Uberaba,  
153 MG, Brasil) com curvas de resfriamento  $-0,25^\circ\text{C}/\text{min}$  e de congelação  $-10^\circ\text{C}/\text{min}$  até  $-80^\circ\text{C}$  e -  
154  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ , até atingir  $-120^\circ\text{C}$ , quando as palhetas foram mergulhadas em  $\text{N}_2$  líquido ( $-196^\circ\text{C}$ ) e  
155 armazenadas em botijões criogênicos.

156

### 157 *Análise da cinética espermática*

158 Os parâmetros de cinética espermática foram avaliados pelo Sistema de Análise  
159 Espermática Computadorizada (CASA; SCA<sup>™</sup>, Microptics, S.L., Version 5.1, Barcelona,  
160 Spain) utilizando os seguintes *sttings*: magnificação 100 x; número de imagens; imagens por  
161 segundo 24; área de cabeça 4 a  $75 \mu\text{m}^2$ ; VAP; lento  $10 \mu\text{m}/\text{s} < \text{médios } 45 \mu\text{m}/\text{s} < \text{rápidos } 90$   
162  $\mu\text{m}/\text{s}$ ; progressividade 75% STR; circular 50% LIN.

163 Para realizar essas análises, foram utilizadas amostras do sêmen descongeladas à  
164 temperatura de  $37^\circ\text{C}$  por 30 segundos, sem nenhuma diluição posterior. Para cada amostra  
165 analisada, uma alíquota de  $5 \mu\text{L}$  de sêmen foi colocada sobre lâmina e coberta com lamínula  
166 ( $18 \times 18 \text{ mm}$ ), ambas pré-aquecida a  $37^\circ\text{C}$  e avaliadas em microscopia de contraste de fase  
167 (Eclipse 50i, Nikon, Japan). Para cada amostra, pelo menos 500 espermatozoides foram  
168 registrados em cinco campos aleatórios não consecutivos, pelo mesmo operador.

169 Na análise de cinética espermática pelo CASA, foram consideradas as seguintes  
170 variáveis, de acordo com Verstegen et al. (2002): motilidade total (MT, %), motilidade  
171 progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), velocidade  
172 progressiva (VSL,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m}/\text{s}$ ), deslocamento lateral da cabeça  
173 (ALH,  $\mu\text{m}$ ), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %), espermatozoides rápidos (RAP,  
174 %), frequência de batimentos (BCF, Hz) e índice de oscilação ou wobble (WOB, %).

175 *Análise de integridade de membranas plasmática e acrossomal*

176 Para a técnica de associações das sondas PI e FITC-PNA, utilizou-se uma amostra de  
177 50µL de sêmen, adicionada a 1,5mL de solução PBS (Fosfato Salino Tamponado) e  
178 centrifugada a 600g durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi  
179 ressuscitado com 35µL de PBS, logo após foi adicionado a amostra 1µL de PNA, 2µL de IP  
180 e 5µL de Glutaraldeído a 4%.

181 Para análise de integridade das membranas plasmática e acrossomal (iPAM), as  
182 amostras foram incubadas a 37 °C por 10 minutos com 1 µL de FITC-conjugada ao *Peanut*  
183 *agglutinin* (FITC-PNA; 200 µg/mL) e 2 µL de iodeto de propídeo (IP; 0,5 mg/mL) em PBS.  
184 Após coloração, os espermatozóides foram fixados com 5,0 µL de paraformaldeído a 4%,  
185 incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e avaliados.

186 Os espermatozóides foram classificados como portadores de: membranas plasmática e  
187 acrossomal íntegras (IP-/PNA-), membranas plasmática íntegra e acrossomal danificada (IP-  
188 /PNA+), membranas plasmática danificada e acrossomal íntegra (IP+/PNA-) e membranas  
189 plasmática e acrossomal danificadas (IP+/PNA+).

190 Todas as análises foram realizadas utilizando o citômetro de fluxo  
191 AmnisImageStream<sup>®x</sup> Mark II (EMD Millipore Corp.), equipado com microscópio com  
192 objetiva de 60x, com taxa de imagem de 5000 células/segundo. O tamanho das células e a  
193 velocidade do fluxo foi de 7,0 µm e 44 mm/seg., respectivamente. A aquisição das imagens  
194 brutas foi obtida através do software INSPIRE<sup>®</sup>. As análises das imagens brutas foram  
195 realizadas através do software IDEAS<sup>®</sup> (versão 6.0).

196 Um laser de excitação de 488 nm com intensidade definida para 55,0 mV (PNA/IP) foi  
197 utilizado. Aproximadamente 5000 eventos foram colhidos por amostra. FITC-PNA coletados  
198 no canal 2 (505-560nm) e IP foi coletado no canal 5 (640-745 nm).

199

## 200 *Análise Estatística*

201 As análises dos dados foram realizadas utilizando o software GraphPad InStat versão  
202 3.10. Os dados foram testados para distribuição normal usando o teste Kolmogorov-Smirnov.  
203 Quando necessário, os dados foram transformados por meio do log ou raiz quadrada para  
204 obter normalidade de distribuição. As variáveis expressas em porcentagem foram  
205 transformadas por arco seno (arco seno  $\sqrt{P/100}$ ).

206 A influência do coloide e dos diluentes sobre as variáveis de qualidade seminal foram  
207 testadas por análise de variância (ANOVA) para mensurações repetidas, seguidas pelo teste  
208 de comparação múltipla de Tukey-Kramer. As diferenças foram consideradas significativas  
209 quando  $P < 0,05$ .

210

## 211 **Resultados**

212 Os resultados relacionados às variáveis de cinética espermática computadorizada  
213 (CASA) e integridade das membranas plasmática e acrossomal (sondas fluorescentes  
214 associado ao Citômetro de Fluxo) pós-descongelamento estão expostos na Tab. 1.

215 Com relação aos parâmetros do CASA, pode-se observar que o grupo A1,  
216 centrifugado com o coloide, teve resultado superior nas variáveis LIN e WOB, comparadas  
217 com o grupo E1. Já as variáveis, RAP, VCL, VAP, ALH e BCF, tiveram resultados inferiores  
218 quando centrifugadas com o colóide, grupo A1 em relação ao grupo E1.

219 Com relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal, pode-se observar  
220 que os grupos A1 e A3, que foram centrifugados com o coloide, tiveram resultado superior  
221 aos grupos E1 e E3, que foram centrifugados sem o coloide. Já no grupo A2, centrifugado  
222 com colóide, comparado com grupo E2, centrifugado sem o colóide, não houve diferença  
223 significativa nos valores.

224

225

**Discussão**

226

Houve influência da centrifugação com coloide sobre os resultados dos diluente 1 e 3.

227

No diluente 1, houveram diferenças nos resultados dos parâmetros de cinética espermática e

228

da integridade das membranas plasmática e acrossomal, já o diluente 3 houveram diferenças

229

somente na integridade das membranas plasmática e acrossomal.

230

Pode-se observar que o grupo A1, centrifugado com o coloide, teve resultado superior

231

nas variáveis LIN e WOB, comparadas com o grupo E1. Já as variáveis, RAP, VCL, VAP,

232

ALH e BCF, tiveram resultados inferiores quando centrifugadas com o colóide, grupo A1 em

233

relação ao grupo E1.

234

Com relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal, pode-se observar

235

que os grupos A1 e A3, que foram centrifugados com o coloide, tiveram resultado superior

236

aos grupos E1 e E3, que foram centrifugados sem o coloide.

237

No presente estudo, os resultados de integridade de membranas foram semelhantes aos

238

observados por Macías García et al. (2009). Porém, nos resultados de cinética, Macías García

239

et al. (2009) observaram uma melhoria significativa nos parâmetros VAP, VCL, VSL, MP,

240

que foram diferentes do presente estudo. Uma diferença na metodologia foi que Macías

241

García et al. (2009) realizaram a centrifugação pós-descongelamento.

242

Guimarães et al. (2015) estudaram o efeito da SLC antes da criopreservação sobre a

243

cinética espermática após o descongelamento. Eles relatam que a SLC com o uso do

244

Androcoll-E encontraram uma discreta melhoria da cinética espermática em amostras SLC,

245

um aumento de 5% do STR, o que provavelmente não tem implicações práticas. A

246

centrifugação do presente estudo também foi realizada antes da criopreservação, porém os

247

resultados encontrados por Guimarães et al. (2015) foram diferentes. No presente estudo a

248

variável STR não apresentou diferença após o uso do coloide.

249 Geralmente ocorrem quedas esperadas nos valores de integridade da membrana plasmática do  
250 espermatozoide após a criopreservação, que são provocadas por formação de cristais de gelo e  
251 mudanças intracelulares, provocando desidratação e morte celular (FRANCISCO JÚNIOR et  
252 al., 2015). Porém, pode-se observar aumento no número de espermatozoides com membranas  
253 íntegras após uso do coloide, comprovando que sua função foi eficaz.

254 Segundo Gutiérrez-Cepeda et al. (2012) a centrifugação coloidal pré-criopreservação  
255 pode aumentar o número de espermatozoides com morfologia normal pós-descongelamento,  
256 assim como melhorar a motilidade, a integridade da membrana e viabilidade espermática. De  
257 acordo com os resultados do atual estudo, a centrifugação coloidal pré-criopreservação foi  
258 capaz de aumentar o número de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal  
259 integrais.

260 Roca et al. (2016) analisaram amostras de sêmen criopreservadas com uso do coloide  
261 pré-criopreservação e pós-criopreservação. Observaram que as amostras que passaram pela  
262 centrifugação com o coloide antes da criopreservação tiveram melhor motilidade e  
263 viabilidade, e menor produção de ROS (espécies reativas de oxigênio).

264 Alguns autores realizaram a centrifugação com coloide pós-criopreservação e outros  
265 pré-criopreservação, porém de acordo com Roca et al. (2016) a remoção de espermatozoides  
266 mortos deve ser feita o mais rápido possível, logo após a ejaculação, tanto para  
267 armazenamento por refrigeração como para criopreservação, pois os espermatozoides mortos  
268 exercem efeitos nocivos sobre os espermatozoides viáveis.

269 Analisando os parâmetros obtidos no grupo E1, que não foi centrifugado com coloide, os  
270 resultados sugerem que possa ter ocorrido uma possível hiperativação espermática, que é um  
271 processo que ocorre durante seu progresso pelo oviduto da fêmea, sendo descrito como um  
272 movimento vigoroso, não progressivo, não linear e está relacionado com o processo de  
273 capacitação e fertilização. Durante esse processo, o padrão e o vigor da trajetória do

274 espermatozóide são alterados, passando a ser caracterizados por uma larga amplitude do  
275 batimento flagelar, aumento médio do movimento lateral da cabeça e cauda do  
276 espermatozóide associados também com uma motilidade lenta ou não progressiva de baixa  
277 frequência de batimento flagelar (VERTESGEN et al., 2002).

278 De acordo com Vertesgen et al. (2002), a falha da fertilização tem sido correlacionada com  
279 algumas populações de espermatozoides que perderam a sua motilidade vigorosa pela  
280 hiperativação por causa de uma incubação prolongada *in vitro*. No presente estudo, caso tenha  
281 ocorrido hiperativação espermática no grupo E1, que não foi centrifugado com coloide,  
282 implica em diminuição da taxa de fertilidade, já que a hiperativação é um processo fisiológico  
283 que ocorre no oviduto da fêmea e não deveria ocorrer no sêmen *in vitro*.

284 Vários estudos têm sugerido que a hiperativação faça que os espermatozóides saiam do  
285 reservatório do oviduto e tenham um maior impulso para a penetração do cumulus, auxiliando  
286 na penetração através da zona pelúcida oócito. Nos seres humanos, os espermatozóides não  
287 capacitados apresentam cerca de 0,4% de hiperatividade, atingindo cerca de 22% em  
288 ejaculados férteis, demonstrando que a hiperatividade espermática está relacionada com altas  
289 taxas de fertilidade do sêmen. No sêmen humano, o espermatozóide hiperativado é aquele que  
290 apresenta:  $VCL \geq 70\mu\text{m/s}$ ,  $ALH \geq 7\mu\text{m}$ ,  $LIN \geq 30\%$  e  $VSL \geq 30 \mu\text{m}$  (VERTESGEN et al.,  
291 2002).

292

293

### Conclusão

294 O uso do coloide na SLC proporcionou resultados de membrana plasmática intacta e  
295 acrossomo intacto estatisticamente superiores nos diluentes 1 e 3, em relação aos mesmos  
296 diluentes sem o uso do coloide, indicando que o coloide foi eficaz para preservar a integridade  
297 das membranas plasmática e acrossomal nesses grupos. Caso a hipótese de ter ocorrido  
298 hiperativação espermática no grupo E1, que não foi centrifugado com coloide, o coloide

299 evitou o processo da hiperativação espermática, o que possivelmente implicará que essas  
300 amostras tenham uma maior taxa de fertilização.

301 De acordo com outros estudos, pode-se sugerir também que o sêmen centrifugado com  
302 o coloide pré-criopreservação terá uma menor produção de ROS, conseqüentemente, uma  
303 melhor qualidade espermática pós-descongelamento e conseqüente maior taxa de fertilização.

304

305

### **Agradecimentos**

306 Ao Haras Monte Verde; ao Dr Oswaldo Christiano Gomes Neto; à Empresa Minitub  
307 do Brasil; à CAPES pelo apoio financeiro; ao Prof. José Wilton Pinheiro Júnior.

308

309

### **Referências**

310 **Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL.** Amides as  
311 cryoprotectants for freezing stallion sêmen: A review. *Animal Reproduction Science*, v.89,  
312 p.105-113, 2005.

313 **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.** Manual para Exame Andrológico e Avaliação  
314 de Sêmen Animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA. 2013. 104 pp.

315 **Francisco Júnior A, Liveira RA, Oliveira FJC, Oliveira Filho BD, Gambarini ML.**  
316 Cisteína como antioxidante para a criopreservação de sêmen de garanhões considerado de  
317 baixa congelabilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.39, n.2, p.301-306, 2015.

318 **Fürst R, Carvalho GR, Pugliesi G.** Efeito de diferentes tempos de equilíbrio na  
319 criopreservação de sêmen de garanhões. *Revista Brasileira Ciências Veterinárias*, v.19, n.3,  
320 p.172-177, 2012.

321 **Guimarães T, Lopes G, Pinto M, Silva E, Miranda C, Correia MJ,**  
322 **Damásio L, Thompson G, Rocha A.** Colloid centrifugation of fresh stallion semen before

- 323 cryopreservation decreased microorganism load of frozenthawed semen without affecting  
324 seminal kinetics. *Theriogenology*, v.83, p.186–191, 2015.
- 325 **Gutiérrez-Cepeda L, Fernández A, Crespo F, Ramírez MA, Gosálvez J, Serres C.** The  
326 effect of two pre-cryopreservation single layer colloidal centrifugation protocols in  
327 combination with different freezing extenders on the fragmentation dynamics of thawed  
328 equine sperm DNA. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.54, n.72, p.1-8, 2012.
- 329 **Macías García B, González Fernández L, Morrell JM, Ortega Ferrusola C, Tapia JA,**  
330 **Rodríguez Martínez H, Penã FJ.** Single-Layer Centrifugation Through Colloid Positively  
331 Modifies the Sperm Subpopulation Structure of Frozen–Thawed Stallion Spermatozoa.  
332 *Reproduction Domestic Animal*, v.44, p.523–526, 2009.
- 333 **Morrell JM, Rodríguez-Martinez H.** Biomimetic techniques for improving sperm quality in  
334 animal breeding: a review. *Open Andrology Journal*, v.1, p. 1–9, 2009.
- 335 **Morrell JM, Timoney P, Klein C, Shuck K, Campos J, Troedsson M.** Single-Layer  
336 Centrifugation Reduces Equine Arteritis Virus Titre in the Semen of Shedding Stallions.  
337 *Reproduction Domestic Animal*, v.48, p.604–612, 2013.
- 338 **Oliveira GC, Oliveira BMM, Celeghini ECC, Fernandes CB, Mattos, CB.**  
339 Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*,  
340 *Belo Horizonte*, v.37, n.1, p.23-28, 2013.
- 341 **Pimentel CA, Carneiro GF.** Biotécnicas Aplicadas à Reprodução de Equinos, In:  
342 Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREIDO, J.R.;  
343 FREITAS, V.J.F. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap.8, p.145-159.
- 344 **Roca J, Martínez-Alborcia MJ, Gil MA, Parrilla I, Martínez EA.** Dead spermatozoa in  
345 raw semen samples impair in vitro fertilization outcomes of frozen-thawed spermatozoa.  
346 *Fertility and Sterility*, v.100, n.3, 2013.

347 **Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, Mccue PM, Bruemmer JE.**  
348 Cooled and frozen stallion semen. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory,  
349 Colorado State University, Bulletin n.9, 1999.

350 **Squires EL, Lindsey AC, Buchanan BR.** A method to obtain pregnancies in mares using  
351 minimal sperm numbers. In: American Association of Equine Practitioners, 46, San Antonio,  
352 Proceedings..., p.335, 2000.

353 **Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K.** Computer assisted semen analyzers in andrology  
354 research and veterinary practice. Theriogenology, v.57, p.149-179, 2002.

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

**Ilustrações**

373 Tabela 1. Resultados das análises pós-descongelamento referentes à cinética espermática e a  
374 integridade das membranas plasmática e acrossomal

Variável	Tratamentos					
	Grupo A			Grupo E		
	A1	A2	A3	E1	E2	E3
MT	43,6 ± 12,2 <sup>Aa</sup>	12,0 ± 7,1 <sup>Ab</sup>	19,0 ± 9,8 <sup>Ab</sup>	38,4 ± 13,4 <sup>Aa</sup>	16,4 ± 12,2 <sup>Ab</sup>	13,6 ± 9,8 <sup>Ab</sup>
MP	21,8 ± 8,0 <sup>Aa</sup>	3,2 ± 2,7 <sup>Ab</sup>	5,2 ± 3,5 <sup>Ab</sup>	20,2 ± 7,7 <sup>Aa</sup>	4,3 ± 5,4 <sup>Ab</sup>	4,1 ± 4,3 <sup>Ab</sup>
RAP	4,6 ± 3,9 <sup>Ba</sup>	0,3 ± 0,5 <sup>Ab</sup>	0,8 ± 0,8 <sup>Ab</sup>	7,5 ± 3,4 <sup>Aa</sup>	0,7 ± 0,7 <sup>Ab</sup>	1,2 ± 1,4 <sup>Ab</sup>
VCL	60,1 ± 12,9 <sup>Ba</sup>	46,1 ± 10,6 <sup>Ab</sup>	45,7 ± 10,1 <sup>Ab</sup>	77,8 ± 10,8 <sup>Aa</sup>	48,1 ± 8,2 <sup>Ab</sup>	54,0 ± 11,1 <sup>Ab</sup>
VSL	44,4 ± 6,6 <sup>Aa</sup>	29,2 ± 6,2 <sup>Ab</sup>	30,1 ± 8,3 <sup>Ab</sup>	50,5 ± 4,9 <sup>Aa</sup>	28,5 ± 6,8 <sup>Ab</sup>	31,4 ± 7,9 <sup>Ab</sup>
VAP	50,7 ± 8,7 <sup>Ba</sup>	35,1 ± 7,1 <sup>Ab</sup>	35,9 ± 9,0 <sup>Ab</sup>	60,2 ± 5,5 <sup>Aa</sup>	35,8 ± 7,4 <sup>Ab</sup>	40,1 ± 8,1 <sup>Ab</sup>
LIN	74,9 ± 6,4 <sup>Aa</sup>	64,1 ± 8,4 <sup>Ab</sup>	65,3 ± 6,9 <sup>Ab</sup>	65,8 ± 9,0 <sup>Ba</sup>	59,0 ± 8,5 <sup>Aa</sup>	58,4 ± 11,6 <sup>Aa</sup>
STR	87,9 ± 2,8 <sup>Aa</sup>	83,2 ± 4,1 <sup>Aa</sup>	83,2 ± 4,4 <sup>Aa</sup>	83,9 ± 5,2 <sup>Aa</sup>	79,2 ± 6,4 <sup>Aab</sup>	77,6 ± 7,7 <sup>Ab</sup>
WOB	85,2 ± 5,1 <sup>Aa</sup>	77,0 ± 8,3 <sup>Ab</sup>	78,3 ± 4,7 <sup>Ab</sup>	78,0 ± 6,5 <sup>Ba</sup>	74,2 ± 6,5 <sup>Aa</sup>	74,7 ± 8,4 <sup>Aa</sup>
ALH	1,9 ± 0,5 <sup>Ba</sup>	1,7 ± 0,7 <sup>Aa</sup>	1,9 ± 0,5 <sup>Aa</sup>	2,6 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	1,8 ± 0,6 <sup>Ab</sup>	1,9 ± 0,5 <sup>Ab</sup>
BCF	9,5 ± 1,7 <sup>Ba</sup>	8,0 ± 2,8 <sup>Aa</sup>	9,2 ± 2,1 <sup>Aa</sup>	11,9 ± 1,4 <sup>Aa</sup>	8,5 ± 3,0 <sup>Ab</sup>	8,8 ± 2,4 <sup>Ab</sup>
PNA-/IP-	41,0 ± 8,2 <sup>Aa</sup>	22,2 ± 8,8 <sup>Ab</sup>	32,4 ± 7,0 <sup>Ac</sup>	28,3 ± 11,2 <sup>Ba</sup>	16,5 ± 8,7 <sup>Ab</sup>	20,3 ± 9,5 <sup>Bb</sup>

375 Grupo A: centrifugado com coloide (AndroColl<sup>®</sup>-E), Grupo E: centrifugado sem coloide  
376 (AndroColl<sup>®</sup>-E), A1: diluente 1 (Botucrio<sup>®</sup>), A2: diluente 2 (EquiPlus<sup>®</sup> Freeze + 3% glicerol),  
377 A3: diluente 3 (EquiPlus<sup>®</sup> Freeze + 3% DMSO), E1: diluente 1 (Botucrio<sup>®</sup>), E2: diluente 2  
378 (EquiPlus<sup>®</sup> Freeze + 3% glicerol), E3: diluente 3 (EquiPlus<sup>®</sup> Freeze + 3% DMSO). Letras  
379 maiúsculas diferentes (A, B) indicam comparação entre Grupo A (centrifugado com colóide  
380 AndroColl) com Grupo E (centrifugado sem colóide AndroColl). Letras minúsculas diferentes  
381 (a, b, c) indicam comparação entre as diferentes diluentes, dentro do mesmo grupo. O nível de  
382 significância de 5% considerado no teste de Tukey foi de 5,0%.