

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Sonicação e centrifugação na criopreservação de sêmen equino

Maria Isabel dos Santos

Pelotas, 2020

Maria Isabel dos Santos

Sonicação e centrifugação na criopreservação de sêmen equino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Dra. Carine Dahl Corcini
Coorientador: Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S237s Santos, Maria Isabel dos

Sonicação e centrifugação na criopreservação de sêmen equino / Maria Isabel dos Santos ; Carine Dahl Corcini, orientadora ; Antonio Sergio Varela Junior, coorientador. — Pelotas, 2020.

47 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Cavalo crioulo. 2. Inseminação artificial. 3. Tris-gema - Diluente - Sonicação. I. Corcini, Carine Dahl, orient. II. Varela Junior, Antonio Sergio, coorient. III. Título.

CDD : 636.108982

Maria Isabel dos Santos

Sonicação e centrifugação na criopreservação de sêmen equino

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/08/2020

Banca examinadora:

Profa. Dra. Carine Dahl Corcini (Orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Ilusca Sampaio Finger
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Stela Mari Meneghello Gheller
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Eliza Rossi Komninou
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

À minha mãe

Agradecimentos

Não caberiam em palavras os agradecimentos necessários a todos que foram apoiadores, incentivadores e companheiros nessa etapa.

A minha mãe, que nunca mediu esforços para eu voar o mais alto que pudesse, obrigada, você é a maior das minhas mestras.

Aos bons amigos que fiz durante está caminhada, vocês que nunca deixaram que me desanimasse, e foram sol nos dias mais turbulentos. Gosto muito daquele velho ditado “sozinho vamos mais rápido, mas juntos vamos mais longe”, meus queridos Andreia Anciuti, Stela Gheller, Camila Brito, Norton Gatti, Pablo Fracaro, Felipe Hartwig, todos sempre serão lembrados com carinho dos momentos pelas risadas, pelo auxílio e pelos conhecimentos transmitidos.

A Central de Reprodução Hartwig que abriu suas portas para nosso projeto.

A minha orientadora querida, que acima de tudo, se tornou minha grande amiga, obrigada Dra. Carine Corcini, por toda paciência e amor ao nosso projeto.

Ao programa da pós-graduação UFPel, a Daiane do Amaral, aos colegas de Repropel e a todos que fizeram este sonho possível.

Ao meu amor, Bruno Predebon, que sempre arrumou solução para todos os meus problemas, sem mesmo entender a causa, você é ímpar, sorte a minha ter você.

Meus sinceros agradecimentos.

***“Em tudo há sempre uma coisa boa para se ser grato se você procurar o suficiente para descobrir onde está.”
(Eleanor H. Porter)***

Resumo

SANTOS, Maria Isabel. **Sonicação e centrifugação na criopreservação de sêmen equino. Dissertação.** 2020. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Com o aumento do potencial de criação equina, biotecnologias reprodutivas se tornam importantes ferramentas na produção, com destaque para a inseminação artificial. Nos protocolos estabelecidos para manutenção do ejaculado são utilizados diluidores que possuem em sua constituição, nutrientes para manter o metabolismo celular, além de substâncias para proteção celular como a gema de ovo, sendo fundamentais para os processos de resfriamento e congelamento. O objetivo deste estudo foi diminuir os tamanhos das partículas da lipoproteína de baixa densidade, através de processos de sonicação no diluente Tris gema para o congelamento das células espermáticas equinas. Nesse experimento foram utilizados 19 animais com idade entre 4 a 8 anos da raça Crioula, a coleta do sêmen foi realizada com o método de vagina artificial. As amostras deveriam apresentar um padrão de motilidade $\geq 70\%$ e patologias $\leq 30\%$. Os ejaculados foram testados em 4 tratamentos diferentes: Tratamento 1 (T1) – controle Tris-gema; Tratamento 2 (T2) – Tris-gema centrifugado três vezes consecutivamente à 10.000 RCF na temperatura de 4°C/45 min; Tratamento 3 (T3) Tris-gema sonicado por 30 min em amplitude de 50% com ponteira de sonda de 3mm; Tratamento 4 (T4) Tris-gema centrifugado três vezes consecutivamente à 10.000 G na temperatura de 4°C/45 min e sonicado por 30 min em amplitude de 50% com ponteira de sonda de 3mm. Posteriormente se realizou o processo de criopreservação com curva de congelamento de 0,5°C/min até 5°C, estabilização por 30 min, seguida de adição de crioprotetor e envase em palhetas de 0,5 ml e expostas ao vapor de nitrogênio líquido (-80 ° C) por 10 min e congeladas a -196°C. Pós descongelamento se realizou avaliações in vitro de cinética espermática em sistema computadorizado (CASA), e avaliações de integridade estrutural em microscopia de fluorescência para parâmetros de integridade de membrana, DNA e acrossoma e funcionalidade mitocondrial. Para avaliação estatística foi utilizado o programa computacional Statistix 9® (Statistix, Statistix 9 for Windows, Analytical Software, Tallahassee, FL, USA, 2008). O nível de significância foi de $p < 0,05$. O diluente que utilizou a sonicação como alternativa para diminuir as partículas de LDL apresentaram melhora nos parâmetros de motilidade total e progressiva, A funcionalidade de mitocôndria não apresentou diferença entre os tratamentos. A percentagem de DNA íntegro e integridade de acrossoma o controle com tris-gema foi superior aos demais tratamentos. A composição química do LDL é pouco complexa quando comparada a um diluente de gema de ovo, assim, direta ou indiretamente o LDL tem a capacidade de diminuir as alterações na membrana plasmática, e os processos de sonicação promove uma redução na partícula da LDL. Com base nos resultados obtidos neste estudo, o tratamento que obteve resultados similares ao controle em integridade de membrana celular foi o T3, sendo que todos

os testados foram superiores ao controle no parâmetro de motilidade total e progressiva.

Palavras-chave: diluente; cavalo crioulo; inseminação artificial; sonicação; Tris-gema

Abstract

SANTOS, Maria Isabel. **Sonication and centrifugation in cryopreservation of equine semen.** 2020. 47f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

With the increase in the potential for equine breeding, reproductive biotechnologies become important tools in production, with emphasis on artificial insemination. In the protocols established for the maintenance of ejaculate, thinners are used that have nutrients to maintain cellular metabolism, in addition to substances for cellular protection such as egg yolk, which are fundamental for the cooling and freezing processes. The objective of this study was to reduce the particle sizes of low density lipoprotein, through sonication processes in the tri-yolk diluent for the freezing of equine sperm cells. In this experiment, 19 Creole animals aged 4 to 8 years were used, semen collection was performed using the artificial vagina method. The samples should show a motility pattern $\geq 70\%$ and pathologies $\leq 30\%$. Ejaculates were tested in 4 different treatments: Treatment 1 (T1) – Tris egg-yolk control; Treatment 2 (T2) – Tris egg-yolk centrifuged three times consecutively at 10,000 RCF at a temperature of 4°C / 45 min; Treatment 3 (T3) Tris egg-yolk sonicated for 30 min in 50% amplitude with a 3mm probe tip; Treatment 4 (T4) Tris egg-yolk centrifuged three times consecutively at 10,000 G at a temperature of 4°C / 45 min and sonicated for 30 min at 50% amplitude with a 3mm probe tip. Subsequently, the cryopreservation process was carried out with a freezing curve of 0.5°C / min to 5°C, stabilization for 30 min, followed by the addition of cryoprotectant and filling in 0.5 ml straws and exposed to liquid nitrogen vapor (-80 ° C) for 10 min and frozen at -196 ° C. After thawing, in vitro evaluations of sperm kinetics were performed in a computerized system (CASA), and structural integrity evaluations under fluorescence microscopy for parameters of membrane integrity, DNA and acrosome and mitochondrial functionality. For statistical evaluation, the computer program Statistix 9® (Statistix, Statistix 9 for Windows, Analytical Software, Tallahassee, FL, USA, 2008) was used. The level of significance was $p < 0.05$. The diluent that used sonication as an alternative to decrease LDL particles showed improvement in the parameters of total and progressive motility. The functionality of mitochondria showed no difference between treatments. The percentage of whole DNA and acrosome integrity in the control with tris egg-yolk was higher than the other treatments. The chemical composition of LDL is not very complex when compared to an egg yolk diluent, thus, directly or indirectly LDL has the ability to decrease changes in the plasma membrane, and the sonication processes promote a reduction in the LDL particle. Based on the results obtained in this study, the treatment that obtained results similar to the control in cell membrane integrity was T3, and all those tested were superior to the control in the parameter of total and progressive motility.

Keywords: artificial insemination; crioulo horse; extender; sonication; Tris-egg-yolk

Lista de Figuras

Figura 1	Motilidade total e progressiva e membrana íntegra após o congelamento nos diferentes diluentes.....	41
----------	---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1	Fórmula do diluente de resfriamento (fração A) e do diluente de congelamento (fração B).....	38
Tabela 2	Efeito da criopreservação seminal em equinos submetidos a tratamento utilizando diluente base tris gema: controle; centrifugação à 10.000 RCF na temperatura de 4°C/45 minutos, processo de sonicação, sonicado e centrifugado, sobre parâmetros de integridade de acrossoma, DNA, funcionalidade de mitocôndria, e parâmetros de cinética espermática (média ± erro padrão da média).....	39

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALH	Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Trifosfato de Adenosina
BCF	Frequência de Batimento Cruzado
BSP	Proteínas do Plasma Seminal de Bovinos
CASA	<i>Computer-assisted Sperm Analysis</i>
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
DAP	Distância média percorrida
DCL	Distância Percorrida Real
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSL	Distância Percorrida em Linha Reta
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FITC	Conjugado de Lectina de <i>Arachis hypogaea</i>
FL	Florida
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>

IP	Iodeto de Propídeo
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LIN	Linearidade
MO	<i>Missouri</i>
MOP	Motilidade Progressiva
MOT	Motilidade Total
NaCl	Cloreto de Sódio
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
ReproPel	Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal
STR	Retilinearidade
T1	Tratamento 1
T2	Tratamento2
T3	Tratamento 3
T4	Tratamento 4
TNE	Tris-NaCl-EDTA
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
USA	<i>United States of America</i>
VAP	Velocidade Média de Percurso
VCL	Velocidade em Linha Curvilínea
VSL	Velocidade Retilinear
WOB	Coefficiente de Oscilação

Lista de Símbolos

%	Porcento
RCF	Força G
°C	Graus Celsius
Min	Minuto(s)
®	Marca Registrada
-	Menos
≥	Maior ou igual
V/V	Volume de soluto por Volume de diluente
mm	Milímetro(s)
mL	Mililitro(s)
x	Vezes
μL	Microlitro(s)
s	Segundo(s)
mOsm	Miliosmol(es)
Kg	Quilograma(s)
mM	Milimolar(es)
M	Mol(es)
μM	Micromolar(es)
mg	Miligrama(s)
nm	Nanômetro(s)

<	Menor
g	Gramas(s)
±	Mais ou Menos
P	Valor de P

Sumário

1 Introdução.....	17
2 Artigo.....	20
3 Considerações Finais.....	42
Referências.....	43

1 Introdução

Os equinos chegaram ao Sul do país no século XVI, porém sua importância no aspecto econômico só surgiu em meados do século XVIII com a indústria do charque, na região entre o Rio Pelotas e São Gonçalo, assim rapidamente o Rio Grande do Sul se tornou um grande fornecedor de equinos para outras regiões (LIMA *et al.*, 2006). No século XIX o exército iniciou a formação da reserva dos equinos para a segurança nacional, iniciando a primeira coudelaria Nacional de Saican (LIMA *et al.*, 2006; GUERRA, 2010). Segundo dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) no ano de 2014 o Brasil possuía o quarto maior rebanho mundial de equinos.

Com o passar do tempo os animais foram ganhando destaque em atividades de esporte e lazer, além de estarem diretamente relacionados ao agronegócio nacional, destacando o agronegócio que gera 640 mil empregos diretos (GUERRA, 2010; LIMA *et al.*, 2012). O crescimento dos sistemas de criação equina, desencadeou a necessidade de desenvolvimento de técnicas de manejo que possibilitem o melhor desempenho e aproveitamento reprodutivos dos rebanhos (BRANDÃO, 2008). Neste contexto, as biotecnologias reprodutivas se tornam importantes ferramentas para o melhoramento genético e melhor aproveitamento do potencial reprodutivo dos rebanhos, possibilitando uma centena de descendentes de um garanhão com ótimas aptidões (CANISSO *et al.*, 2008).

Entre as possibilidades de biotecnologias, a inseminação artificial em equinos é a mais amplamente utilizada (LOOMIS, 2006). Esta técnica pode ser realizada através do uso de sêmen fresco, resfriado ou congelado. Para o uso do sêmen refrigerado e criopreservado, os meios de diluição que serão adicionados ao processamento são fundamentais para a manutenção celular, pois serão essas as responsáveis na proteção espermática contra o choque térmico, desidratação e formação de cristais de gelo intra e extracelulares (SQUEFF FILHO *et al.*, 2017).

A utilização do sêmen congelado teve aumento em sua demanda, em razão dos custos elevados e dificuldades em transportar os animais. Desta forma, com um incentivo das associações, novas técnicas que melhoram a eficiência do sêmen

congelado surgiram, apensar de a primeira prenhez através desta biotecnologia ter ocorrido apenas há quase meio século (BARKER e GANDIER, 1957).

Nos protocolos estabelecidos para manutenção do ejaculado são utilizados diluidores que possuem em sua constituição, nutrientes para manter o metabolismo celular, além de substâncias para proteção quanto a oscilações de temperatura, osmolalidade e pH, aumentando dessa forma o volume de doses produzidas permitindo fracionar um ejaculado para um maior número de éguas (SQUIRES *et al.*, 1999). Para melhorar ainda mais a capacidade de proteção aos espermatozoides alguns componentes que reduzem os efeitos agressivos do congelamento e descongelamento podem ser adicionados, como o caso do glicerol que veem demonstrados bons resultados, porém seu uso deve ser de forma ponderada devido ao seu potencial tóxico, podendo diminuir a taxa de fertilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O processo de resfriamento e de congelamento podem ser extremamente prejudiciais as células se não forem realizados de forma correta e rigorosa, assim, podendo reduzir a viabilidade e a fertilidade. Dentre os fatores que causam essas perdas, a peroxidação lipídica da membrana plasmática é uma das principais causas, ocasionada pela susceptibilidade e produção excessiva do espermatozoide as espécies reativas de oxigênio (EROs) (MACIAS GARCIA *et al.*, 2011). Pela grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes, estes são facilmente oxidados, o que torna a célula bastante sensível as EROs, também pelo seu pequeno citoplasma, não possuem uma quantidade intracelular de agentes antioxidantes (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Para que haja fecundação são necessários que algumas características da célula espermática pós descongelamento sejam mantidas tais como, motilidade progressiva, enzimas acrossomais íntegras e proteínas da membrana plasmática que são indispensáveis para a sobrevivência no trato reprodutor feminino. A interação entre os componentes do crioprotetor, diluidor, da curva de resfriamento, do processo de criopreservação e também do descongelamento são essenciais para bons resultados no congelamento, prevenindo ao máximo o choque térmico, a formação de cristais de gelo ou a recristalização e a desidratação celular excessiva (PICKETT e AMANN, 1993; JASKO, 1994).

Substâncias que visam amenizar os efeitos deletérios do congelamento do sêmen, são utilizados na diluição, em geral são o leite desnatado, gema de ovo, açúcares, eletrólitos e glicerol em diferentes concentrações (OLIVEIRA *et al.*,

2013). Uma alternativa para a manutenção da estrutura da membrana plasmática é o uso do plasma de gema de ovo, que é composto por 85% de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), estas proteínas podem ser separadas dos grânulos lipídicos pela centrifugação, por serem solúveis (NILSSON *et al.*, 2006). As micelas da LDL se aderem a membrana plasmática, permitindo que fosfolipídios e colesterol entrem na membrana levando a formação de complexos com as proteínas do plasma seminal promovendo um efeito crioprotetor (GRAHAM e FOOTE, 1987; MANJUNATH *et al.*, 2002; BERGERON *et al.*, 2004). Estudos demonstram a ação da LDL, na proteção das células espermáticas contra o choque térmico e manutenção da motilidade após a criopreservação (MOUSSA *et al.*, 2002; PRAPAIWAN *et al.*, 2016). Em bovinos já foi demonstrado que a utilização de LDL é importante para a proteção da membrana no momento da criopreservação (MOUSSA *et al.*, 2002; AMIRAT *et al.*, 2004).

A obtenção do plasma da gema de ovo é realizada por ultracentrifugações, sendo que neste método o que é descartado é o “pellet” e o sobrenadante é preservado e centrifugado novamente, por que este é o plasma da gema (MOUSSA *et al.*, 2002).

Pace e Graham no ano de 1974 já apresentavam resultados em que ao realizar a ultracentrifugação para purificar a gema de ovo haveria uma melhora na capacidade de proteção para o congelamento de sêmen em touros, desta forma ao diminuir o tamanho das moléculas do LDL haveria uma melhor e maior incorporação dos lipídeos pelo espermatozoide, levando – o ao beneficiamento no congelamento e pós-descongelamento (PACE e GRAHAM, 1974; PILLET *et al.*, 2011).

O ultrassom é um meio mecânico de produção de energia, este pode ser utilizado para a obtenção de nanopartículas (DAS e CHAUDHURY, 2011). A vibração intensa gera uma energia, assim sendo capaz de quebrar as moléculas em frações menores (ABISMAIL *et al.*, 1999). Estas estruturas nanométrica possuem qualidades únicas, onde conseguem realizar forte interações na matriz que são inseridas (CHAU *et al.*, 2007; ASSIS *et al.*, 2012).

Com o exposto, este trabalho objetivou analisar os benefícios do processo de centrifugação e sonicação no diluente tris gema para o congelamento das células espermáticas equinas.

2 Artigo

Sonicação do Diluente para Congelamento de Sêmen Equino

Maria Isabel Santos, Felipe Hartwig, Andreia Anciuti, Stela Gheller, Antonio Sergio
Varela Junior, Carine Corcini

Será submetido à revista Ciência Rural

Nanotecnologia no desenvolvimento de diluente de criopreservação de sêmen equino
[Nanotechnology in the development of equine semen cryopreservation diluent]

Maria Isabel Santos¹; Felipe Hartwig², Andreia Ancuti¹, Stela Gheller¹; Antonio Sergio Varella Junior³, Carine Corcini^{1*}

RESUMO

Visando a otimização da reprodução equinas, diversos processamentos e diluentes são realizados buscando esse objetivo. Assim testamos processamentos diversos no diluente Tris – gema com o intuito de reduzir as partículas de lipoproteína através de sonicação e centrifugação dos diluentes. Utilizamos 19 animais com idade de 4 a 8 anos da raça Crioula, provenientes de uma central de reprodução da cidade de Pelotas – RS. Os ejaculados coletados por meio de vagina artificial, foram padronizados com motilidade mínima de 70% e patologias espermáticas de até 30%. O sistema de análise espermática computadoriza CASA foi utilizado para análises dos tratamentos, que foram T1 o grupo controle, apenas o diluente Tris – gema, T2 diluente Tris- gema centrifugado três vezes respectivamente a 10.000 RCF durante 45 minutos a 4°C, o T3 o diluente foi sonicado com ponteira de sonda 3mm na amplitude de 50% durante 30 minutos, e o T4 Tris-gema centrifugado três vezes consecutivamente à 10.000 RCF na temperatura de 4°C/45 min e sonicado por 30 min em amplitude de 50% com ponteira de sonda de 3mm. A criopreservação das amostras foram realizadas com a curva de 0,5°C/ min até chegar na temperatura de 5°C, ao chegar nessa temperatura ficaram em estabilização por 30 minutos,

¹ Núcleo de Ensino e Pesquisa em Reprodução Animal (ReproPel), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS; *Autor de Correspondência: corcinicd@gmail.com

² Hartwig Fertilidade Equina– hartwig.fertilidade.equina@gmail.com

³ Reprodução Animal Comparada (RAC), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande-RS.

adicionado o diluente de congelamento e por fim envasadas nas palhetas de 0,5 mL, expostas ao vapor de nitrogênio por 10 minutos, a uma temperatura de -80°C e então congeladas no nitrogênio líquido a -196°C . As análises pós descongelamento foram realizadas no sistema computadorizado CASA e na microscopia de fluorescência foram analisadas a integridade de membrana, DNA, acrossoma e funcionalidade mitocondrial. O tratamento 3 apresentou melhores resultados nos parâmetros de motilidade total e progressiva, as análises da integridade de DNA e acrossoma foram superiores aos tratamentos, entretanto a funcionalidade da mitocôndria não teve diferença entre os tratamentos. Assim, com os resultados positivos desse estudo o tratamento que obteve resultados similares ao controle em integridade de membrana celular foi o T3. Ao analisarmos as motilidades totais e progressivas, todos os grupos apresentaram resultados superiores ao grupo controle, mostrando que os tratamentos não causaram prejuízos as células.

Palavras-chave: sêmen, sonicação, tris gema, CASA, nanotecnologia

ABSTRACT

In order to optimize equine reproduction, several processing and diluents are carried out in order to achieve this objective. So we tested different processes in the Tris-yolk diluent in order to reduce the lipoprotein particles through sonication and centrifugation of the diluents. We used 19 Crioula animals aged 4 to 8 years, from a breeding center in the city of Pelotas - RS. The ejaculates collected through artificial vagina were standardized with a minimum motility of 70% and sperm pathologies of up to 30%. The Computer-assisted sperm analysis (CASA) system was used to analyze the treatments, which were the control group T1, only the Tris-yolk diluent, T2 Tris-yolk diluent centrifuged three times respectively at 10,000G for 45 minutes at 4°C , T3 the diluent was sonicated with a 3mm probe tip at 50% amplitude for 30 minutes, and

the T4 Tris-yolk was centrifuged three times consecutively at 10,000 G at 4°C / 45 min and sonicated for 30 min at 50% amplitude with probe tip 3mm. The cryopreservation of the samples was carried out with the curve of 0.5°C / min until reaching the temperature of 5°C, when they reached that temperature, they were stabilized for 30 minutes, adding the freezing diluent and finally filling in the 0.5 ml straws, exposed to nitrogen vapor for 10 minutes, at a temperature of -80°C and then frozen in liquid nitrogen at -196°C. The post-thaw analyzes were performed on the CASA computerized system and on the fluorescence microscopy, the integrity of the membrane, DNA, acrosome and mitochondrial functionality were analyzed. Treatment 3 showed better results in the parameters of total and progressive motility, the analyzes of DNA integrity and acrosome were superior to the treatments, however the functionality of the mitochondria had no difference between the treatments. Thus, with the positive results of this study, the treatment that obtained results similar to the control in cell membrane integrity was T3. When analyzing the total and progressive motilities, all groups showed superior results to the control group, showing that the treatments did not cause damage to the cells.

Key words: semen, egg yolk, sonication, CASA system, nanotechnology

INTRODUÇÃO

Em vista de um melhoramento genético eficiente o sêmen congelado vem sendo cada vez mais requisitado. Entretanto, alguns entraves são encontrados nesta técnica, como a dificuldade de estabelecer um protocolo padrão de congelamento pela grande variabilidade das características seminais existente nos garanhões.

Inúmeras etapas são necessárias para que o processo de congelamento seja obtido com êxito, desta forma a manipulação de forma correta é essencial a fim de diminuir os efeitos deletérios as células. Dentre este efeito negativos, a peroxidação lipídica é a principal, sendo causada pela produção excessiva e susceptibilidade as espécies reativas de oxigênio (EROs). Os equinos possuem grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e pouco citoplasma, sendo assim sensíveis as EROs e com pouca quantidade de antioxidantes intracelulares (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; MACIAS GARCIA et al., 2011).

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) de origem da gema de ovo que são purificadas pelo processo de ultracentrifugação conforme descrito em Pace e Graham em 1974 possibilitando a verificação da melhora na capacidade de crioproteção no sêmen de touro. Assim entende-se que ao diminuir o tamanho da molécula do LDL há uma maior incorporação de lipídios pela célula espermática, á beneficiando no congelamento e pós-descongelamento (PILLET et al., 2011). O LDL permite com que haja uma entrada de fosfolípeos e colesterol para a membrana plasmática e impede com que os mesmos saiam. Desta forma um complexo de proteínas é formado e protege a célula contra o choque térmico (MANJUNATH et al., 2002; BERGERON et al., 2004). A diminuição do tamanho das partículas e as alterações das suas propriedades permite uma maior interação entre a célula e a nanoestrutura (BALBUS et al., 2006; ASSIS et al., 2012).

A ultracentrifugação como meio de obtenção do LDL, porém pode-se utilizar a geração de ultrassom que é um método utilizado para a obtenção de nanopartículas em emulsões

hidrofóbicas (DAS & CHAUDHURY, 2011). O ultrassom atua com a cavitação nas partículas, em alta amplitude e homogeneidade no sistema de ponteira ou sonda reduzindo o tamanho de partículas (MUKHERJEE et al., 2009; ASSIS et al., 2012; JIE PENG et al., 2015).

O objetivo deste estudo é utilizar a sonicação do diluente tris gema, a fim de obter nanopartículas da molécula de LDL, e utilizar na criopreservação seminal de equinos para melhorar a capacidade dos parâmetros espermáticos no momento do descongelamento de sêmen.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e coleta de sêmen

Foram realizadas coleta seminal de 19 garanhões da raça crioulo com idade entre 4 a 8 anos, todos com a mesma dieta e fertilidade conhecida. As coletas de sêmen foram realizadas durante a estação reprodutiva, com auxílio de uma égua em estro e vagina artificial modelo BOTUPHARMA®. Ejaculados com $\geq 70\%$ de motilidade e com patologia espermática inferior a 30% (CBRA, 2013) foram incluídos no experimento, realizado foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Pelotas (REPROPEL- UFPeL).

Após a coleta e avaliação imediata, o sêmen era diluído na proporção de 1:1 (V/V), com diluente para transporte e centrifugação, armazenado em uma caixa de transporte, modelo Botuflex®, previamente resfriada à 15°C (CBRA, 2013).

Preparo do diluente

O diluente Tris-gema foi separado em duas frações, A e B. Fração A sem adição de glicerol, utilizado como diluente de resfriamento, fração B usada como diluente de

congelamento adicionada glicerol. Após esta etapa ser concluída, o diluente era fracionado em quatro tratamentos diferentes (Tabela 1).

Para a obtenção da porção plasmática da gema um processo de ultracentrifugação (Eppendorf Centrifuge 5804R, Alemanha) é realizado, esse consiste em três centrifugações, utilizando o sobrenadante obtido na etapa anterior a 10.000 G durante 45 minutos e 5°C. Para a produção de nanopartículas de LDL o sonicador (sonda Q55, QSonica, EUA) com ponteira de sonda foi utilizado, o diluente era armazenado em tubos cônicos, imersos em recipiente gelado, e sonicados por 30 minutos em amplitude de 50% com ponteira de sonda com 3mm.

Diluição, resfriamento e congelamento

O diluente base foi submetido a sonicação ou centrifugação conforme os tratamentos descrito: Tratamento 1 (T1) – controle Tris-gema; Tratamento 2 (T2) – Tris-gema centrifugado três vezes consecutivamente à 10.000 RCF na temperatura de 4°C/45 min; Tratamento 3 (T3) Tris-gema sonicado por 30 min em amplitude de 50% com ponteira de sonda de 3mm; Tratamento 4 (T4) Tris-gema centrifugado três vezes consecutivamente à 10.000 RCF na temperatura de 4°C/45 min e sonicado por 30 min em amplitude de 50% com ponteira de sonda de 3mm.

Na etapa do pré-congelamento de sêmen, foi analisada motilidade espermática com o auxílio da microscopia computadorizadas (Computer Assisted Semen Analysis - CASA). Amostras com parâmetro de motilidade mínima de 70%, sofriam um processo de centrifugação de 600 RCF/10minutos, sendo o sobrenadante descartado e o “*pellet*” ressuspendido. As amostras foram diluídas com a Fração A do diluente até a concentração final de 100×10^6 espermatozoide/mL em cada um dos tratamentos, cada ejaculado foi dividido em quatro partes para ser submetido a cada tratamento.

A curva de congelamento utilizada foi de 0,5°C/min até chegarem a 5°C, permanecendo nessa temperatura por 30 min para estabilização. Posteriormente o diluente de congelamento, contendo 1,25µL de glicerol, ou seja, a concentração final de glicerol é 5% foi adicionada. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e expostas ao vapor de nitrogênio líquido (-80 ° C) por 10 min e congeladas a -196°C.

Análises da qualidade seminal in vitro pós-descongelamento

As palhetas foram descongeladas em banho-maria em temperatura de 37°C/30s (FILHO et al., 2017). O conteúdo de cada amostra foi novamente ressuspensa em eppendorf contendo 200µL de diluente de congelamento, Bothucurio® (com pH 7.2 e 318mOsm/Kg), a uma temperatura de 22°C para minimizar a toxicidade do crioprotetor após o descongelamento.

A cinética espermática foi realizada através sistema do CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), após 10 minutos de incubação a 37°C foi adicionada 6 µL na lâmina de microscopia óptica sendo recoberta por lamínula. As variáveis analisadas pelo CASA: Motilidade total (MOT), motilidade progressiva (MOP), Distância média percorrida (DAP), Distância Curvilínea (DCL), Distância retilínea (DSL), Velocidade média de percurso (VAP), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade retilinear (VSL), Retilinearidade (STR), Linearidade (LIN), Wobble – oscilação (WOB), Deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (FILHO et al., 2017).

Integridade de membrana plasmática foi avaliada com o processamento de uma amostra de 10µL de sêmen, diluída em 40µL de solução salina isotônica, contendo 1,7 mM de formaldeído, 20 M de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e 7,3 µM de iodeto propídio (IP), passando por incubação durante 5min em sala escura (HARRISON & VICKERS, 1990). As células que apresentavam fluorescência verde foram consideradas íntegras pois não permitiram a saída do CDFA do citoplasma das células, enquanto as células com fluorescência

vermelha ou verde/vermelha indicarem células com membranas lesadas pelo fato do corante IP não conseguir atravessar membranas espermáticas integras.

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada após a incubação de uma amostra de 10 μL de sêmen com 40 μL de solução de rodamina 123 (13 μM), a 20°C durante 10 minutos. Espermatozoides com coloração rodamina positivo (fluorescência verde) foram considerados com mitocôndrias funcionais. Já as mitocôndrias não funcionais caracterizaram-se por coloração negativa com rodamina, isto é, sem fluorescência (HE & WOODS III, 2004).

A integridade de DNA foi avaliada após colocar uma amostra de 45 μL de sêmen em 50 μL de TNE (0,01 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 0,001 M EDTA, pH 7,2). Depois de 30 segundos, 200 μL de solução Triton 1X será adicionado e, 30 segundos depois, 50 μL de laranja de acridina (2 mg / mL em água deionizada). Após cinco minutos, contados 200 espermatozoides; aqueles com fluorescência verde foram considerados com o DNA íntegro, enquanto aqueles com fluorescência vermelha ou laranja considerados com o DNA não íntegro (BENCHARIF et al., 2010).

As análises de integridade de membrana, DNA e funcionalidade de mitocôndria, foram analisadas em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), utilizando-se filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516-617 nm.

A integridade de acrossoma foi avaliada após confecção de esfregaço contendo 20 μL de sêmen. Sob este esfregaço foi adicionado 20 μL de uma solução de IP, após secagem as lâminas foram imersas em álcool etílico absoluto (459844-1L, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) por 5 minutos, lavadas em PBS (Phosphate Buffer Saline), adicionado 20 μL de Conjugado de Lectina de *Arachis hypogaea* - FITC (20 mg/mL), lavadas em água deionizada e drenadas, em sala escura. Na sequência, estas lâminas foram avaliadas em microscópio de epifluorescência sob aumento de 1000x. Foi realizado contagem de 100 espermatozoides, as

células com acrossoma considerados íntegros não apresentavam rugosidades, vacúolos e emitiam fluorescência verde. O demais foi classificado como células com acrossoma danificado (KAWAMOTO et al., 1999).

Análise estatística

As variáveis foram analisadas pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk, análise de variância (ANOVA) e comparação entre medias por Tukey. Para avaliação estatística foi utilizado o programa computacional Statistix 9[®] (Statistix, Statistix 9 for Windows, Analytical Software, Tallahassee, FL, USA, 2008). O nível de significância foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

O diluente que utilizou a sonicação como alternativa para diminuir as partículas de LDL apresentou melhora nos parâmetros de motilidade total e progressiva conforme Figura 1, e a percentagem de membranas íntegras foi igual ao controle.

A funcionalidade de mitocôndria não apresentou diferença entre os tratamentos. A percentagem de DNA íntegro e integridade de acrossoma o controle com tris-gema foi superior aos demais tratamentos (Tabela 2). Nos demais parâmetros avaliados na cinética espermática do sêmen descongelado dos 11 parâmetros avaliados seis apresentaram diferença estatística, demonstrando que o tratamento com centrifugação e sonicação foi superior ao tratamento somente sonicado (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A utilização de sonicação que tem como princípio a diminuição das partículas (microemulsão) neste trabalho demonstrou permitir a manutenção da motilidade total e progressiva superior aos demais tratamentos após o processo de congelação e descongelação.

Importante ressaltar que a utilização da centrifugação tem como um dos princípios a redução de contaminantes prejudiciais a membrana celular (HU et al., 2006).

A composição química do LDL é pouco complexa quando comparada a um diluente de gema de ovo, assim, direta ou indiretamente o LDL tem a capacidade de diminuir as alterações na membrana plasmática. Diversos autores vêm discutindo um dos mecanismos que pode estar ligado a essa boa crioproteção, que seria o sequestro de proteínas BSP presentes no plasma seminal que poderiam impedir o efluxo de lipídios da membrana celular, essa proteína também foi isolada no ejaculado de garanhões, porém em menor quantidade (MANJUNATH et al., 2002; BERGERON et al., 2004).

A interação do LDL com o BSP é principalmente pelos fosfolipídeos, porém, como essa proteína se encontra em grande quantidade no plasma seminal e para o processo de congelamento o plasma é retirado, o espermatozoide não se ligaria mais a esta proteína. Assim, sugerindo que a fixação deve ocorrer antes da centrifugação para remoção do plasma, explicando dessa forma a proteção parcial ao espermatozoide (PILLET et al., 2011).

No parâmetro de motilidade progressiva todos os tratamentos apresentaram valores superiores ao grupo controle. Dentre os diluentes comumente utilizados, a gema de ovo ganha destaque, por ter uma boa capacidade de proteção contra o choque térmico durante a criopreservação (MOUSSA et al., 2002). CORCINI et al. (2016) apresentam também bons resultados, ao utilizar apenas a fração do LDL no congelamento de sêmen canino. PACE and GRAHAM (1974) citam resultados comparando o uso do LDL e do HDL (High Density Lipoproteins), sendo que o HDL foi tóxico para as células. Os melhores resultados observados podem ser explicados, pois, ao se realizar o processo de sonicação, através da microemulsão espera-se que as moléculas de LDL cheguem a tamanhos nano e/ou micro, assim incorporando de forma mais efetiva a célula, melhorando conseqüentemente os parâmetros cinemáticos (TOSIC & WALTON, 1947; KENTISH et al., 2008; PILLET et al., 2011). Em um estudo

realizado por CORCINI et al. (2016) obteve resultados positivos na motilidade, ao utilizar o plasma da gema de ovo, para o congelamento de sêmen canino, justificando que substâncias danosas a respiração e motilidade são retiradas na etapa da centrifugação do diluente.

Nas análises de distancias percorridas, os resultados iguais ou inferiores ao controle, nos leva a crer que as amostras percorram distancias menores, Já ao comparar os dados obtidos na análise de velocidade do trajeto e a velocidade curvilínea, diferenças estatísticas não foram observadas, indicando que as células que sofreram os tratamentos apresentaram movimentos lentos e menos progressivos.

Isso pode ser devido as taxas de funcionalidade mitocondrial, que pós descongelamento apresentaram valores inferiores a 50%, visto que são essas organelas as responsáveis pelo fornecimento de ATP para o batimento flagelar e consequente deslocamento celular. Ainda, Segundo KENTISH et al. (2008), na sonicação espera-se que haja uma microemulsão das moléculas do diluente e que assim, fossem melhores absorvidas pelas células, entretanto as amostras que ficaram expostas aos diluentes centrifugados e sonicados apresentaram resultados não satisfatórios, o que pode estar associado a uma quebra das moléculas dos lipossomas em tamanhos muito pequenos, absorvidos pelas células espermáticas e que levam a queda na motilidade.

O baixo desempenho de mobilidade dos espermatozoides leva a baixas taxas de fertilização in vivo (VERSTEGEN et al., 2002). Ao analisar a integridade da membrana plasmática o tratamento sonicado demonstrou valores estatísticos igual ao tratamento controle. CORCINI et al. (2016) obteve bons resultados ao utilizar o LDL para o sêmen de cães para a proteção da membrana e do acrossoma, isto se deu possivelmente pelo aumento da proteção contra as crioinjúrias devido ao complexo de proteínas plasmáticas que minimiza o efluxo de fosfolípídeos e colesterol para a membrana. O que também já é citado por MANJUNATH et al.

(2002) e BERGERON et al. (2004) onde o LDL atua em forma de barreira, permitindo que os fosfolípidios e colesterol entrem na membrana, mas impedindo que saiam.

Ao analisarmos os dados de integridade acrossomal estes benefícios não foram notados. O que nos leva a crer que houve uma incorporação ineficiente das moléculas, com uma quebra excessiva do LDL. Assim a criocapacitação não foi prevenida, não mantendo a integridade do acrossoma

Na avaliação da integridade do DNA em todos os tratamentos obteve-se valores acima de 90%, sendo um resultado favorável pois nesta estrutura está a informação genética, e com estes tratamentos e curvas realizada na criopreservação deste estudo, foi possível a preservação da informação genômica possivelmente permitindo o desenvolvimento embrionário correto se ocorresse a fertilização pós inseminação.

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais testadas neste estudo, se verificou que os tratamentos testados foram superiores ao controle no parâmetro cinético de motilidade progressiva e total. O tratamento com sonicação manteve valores de integridade de membrana semelhantes ao tratamento controle, e todos os tratamentos mantiveram integridade de DNA superiores a 90%. Desta forma é possível que com um maior refinamento das técnicas utilizadas neste estudo seja possível implementá-las, a fim de incluirmos estes processamentos na rotina do congelamento de sêmen equino.

REFERÊNCIAS

ASSIS, L. M. D., et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, p.99-109. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1981-67232012000200001&nrm=iso>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi.

BALBUS, J. M., et al. Getting it right the first time: developing nanotechnology while protecting workers, public health, and the environment. **Ann N Y Acad Sci**, v.1076, p.331-42. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17119213>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1196/annals.1371.027.

BENCHARIF, D., et al. Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex and LDL (Low Density Lipoproteins). **Animal Reproduction Science**, v.119, n.3-4, p.305-13. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20153943>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.01.009.

BERGERON, A., et al. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of reproduction**, v.70, n.3, p.708-17. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613896>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1095/biolreprod.103.022996.

CBRA, C. B. D. R. A. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013. 49 p.

CORCINI, C. D., et al. Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. **Andrologia**, v.48, n.1, p.114-5. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25735406>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1111/and.12411.

DAS, S.; A. CHAUDHURY. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v.12, n.1, p.62-76. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21174180>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1208/s12249-010-9563-0.

FERREIRA, A. L. A.; L. S. MATSUBARA. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68. 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014&nrm=iso>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi.

FILHO, J. S., et al. Quercetin in equine frozen semen. **Cryo Letters**, v.38, n.4, p.299-304. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29734431>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi.

HARRISON, R.; S. E. VICKERS. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, n.1, p.343-352. 1990. Disponível em: em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1530/jrf.0.0880343.

HE, S.; L. C. WOODS III. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiology**, v.48, n.3, p.254-262. 2004. Disponível em: em: Aug. 07, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.01.009>.

HU, J.-H., et al. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. **Asian-australasian journal of animal sciences**, v.19, n.4, p.486-494. 2006. Disponível em: em: Aug. 07, 2020. doi: 10.5713/ajas.2006.486.

KAWAMOTO, A., et al. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and sterility**, v.71, n.3, p.497-501. 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10065788>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1016/s0015-0282(98)00507-x.

KENTISH, S., et al. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.9, n.2, p.170-175. 2008. Disponível em: em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1016/j.ifset.2007.07.005.

MACIAS GARCIA, B., et al. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, n.5, p.811-8. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144567>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.10.021.

MANJUNATH, P., et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of reproduction**, v.67, n.4, p.1250-8. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297543>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1095/biolreprod67.4.1250.

MOUSSA, M., et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, n.6, p.1695-706. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12035979>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00682-9.

MUKHERJEE, S., et al. Design and evaluation of itraconazole loaded solid lipid nanoparticulate system for improving the antifungal therapy. **Pak J Pharm Sci**, v.22, n.2, p.131-8. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339221>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi.

PACE, M. M.; E. F. GRAHAM. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of animal science**, v.39, n.6, p.1144-9. 1974. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4475048>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.2527/jas1974.3961144x.

PENG, J., et al. Effect of high-pressure homogenization preparation on mean globule size and large-diameter tail of oil-in-water injectable emulsions. **J Food Drug Anal**, v.23, n.4, p.828-835. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28911501>>. Acesso em. doi: 10.1016/j.jfda.2015.04.004.

PILLET, E., et al. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v.75, n.1, p.105-14. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833417>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.07.015.

TOSIC, J.; A. WALTON. Effect of egg-yolk and its constituents on the respiration and fertilizing capacity of spermatozoa. **The Journal of Agricultural Science**, v.37, n.1, p.69-76. 1947. Disponível em: em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1017/S0021859600013095.

VERSTEGEN, J., et al. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.149-79. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11775967>>. Acesso em: Aug. 07, 2020. doi: 10.1016/s0093-691x(01)00664-1.

Tabela1 – Fórmula do diluente de resfriamento (fração A) e do diluente de congelamento (fração B).

Ingredientes	Fração A	Fração B
NaCitrato2H2O	1.856g	1.856g
Glucose	1.0g	1.0g
Água	80 mL	66 mL
Glicerol	-----	14 mL
Gema de ovo	20 mL	20 mL
pH	7.0 com HCL	7.0 com HCL

Tabela 2 – Efeito da criopreservação seminal em equinos submetidos a tratamento utilizando diluente base tris gema: controle; centrifugação à 10.000 RCF na temperatura de 4°C/45 minutos, processo de sonicação, sonicado e centrifugado, sobre parâmetros de integridade de acrossoma, DNA, funcionalidade de mitocôndria, e parâmetros de cinética espermática (média \pm erro padrão da média).

Parâmetros	Controle	Centrifugação	Sonicação	Centr. e Sonic.
Acrossoma íntegro (%)	82 \pm 0.9 ^A	76.38 \pm 0.8 ^B	74.6 \pm 1.1 ^B	68.7 \pm 0.8 ^C
DNA íntegro (%)	98.2 \pm 0.6 ^{AB}	99.1 \pm 0.3 ^A	97.1 \pm 0.7 ^B	99.4 \pm 0.4 ^A
Mitocôndria funcional (%)	48.5 \pm 1.9 ^A	43.5 \pm 2.1 ^A	49.4 \pm 1.5 ^A	45.2 \pm 2.0 ^A
DAP	29.7 \pm 0.2 ^A	29.9 \pm 0.3 ^A	28.73 \pm 0.4 ^B	30.2 \pm 0.3 ^A
DCL	56.2 \pm 0.6 ^B	56.4 \pm 0.8 ^B	54.8 \pm 0.9 ^B	59.1 \pm 0.8 ^A
DSL	23.9 \pm 0.2 ^A	23.62 \pm 0.17 ^A	22.63 \pm 0.28 ^B	23.84 \pm 0.2 ^A
VAP	66.8 \pm 0.6 ^A	66.33 \pm 0.62 ^{AB}	64.89 \pm 0.84 ^B	67.63 \pm 0.6 ^A
VCL	125.7 \pm 1.4 ^B	125.9 \pm 1.7 ^B	123.1 \pm 2.0 ^B	131.5 \pm 1.7 ^A
VSL	53.8 \pm 0.4 ^A	52.9 \pm 0.4 ^A	51.2 \pm 0.6 ^B	53.5 \pm 0.4 ^A
STR	0.8 \pm 0.03 ^A	0.8 \pm 0.04 ^A	0.8 \pm 0.04 ^A	0.8 \pm 0.03 ^A
LIN	0.4 \pm 0.004 ^A	0.4 \pm 0.004 ^A	0.4 \pm 0.004 ^A	0.4 \pm 0.004 ^A
WOB	0.5 \pm 0.03 ^A	0.5 \pm 0.04 ^A	0.5 \pm 0.03 ^A	0.5 \pm 0.03 ^A
BCF	34.5 \pm 0.2 ^A	34.5 \pm 0.3 ^A	33.1 \pm 0.2 ^B	33.6 \pm 0.2 ^B
ALH	3.7 \pm 0.04 ^A	3.6 \pm 0.04 ^A	3.7 \pm 0.04 ^A	3.7 \pm 0.04 ^A

Letras distintas demonstram diferença estatística nas linhas (P<0.05).

Distância média percorrida (DAP), velocidade média de percurso (VAP), Velocidade Curvilínea (VSL), distância percorrida real (DCL), distância percorrida em linha reta (DSL),

velocidade em linha curvilínea (VCL), retilinearidade – VSL/VAP (STR), linearidade (LIN), coeficiente de oscilação – VAP/VCL (WOB), frequência com que o traçado real cruza o traçado médio (BCF), amplitude de deslocamento lateral da cabeça em relação ao traçado médio (ALH).

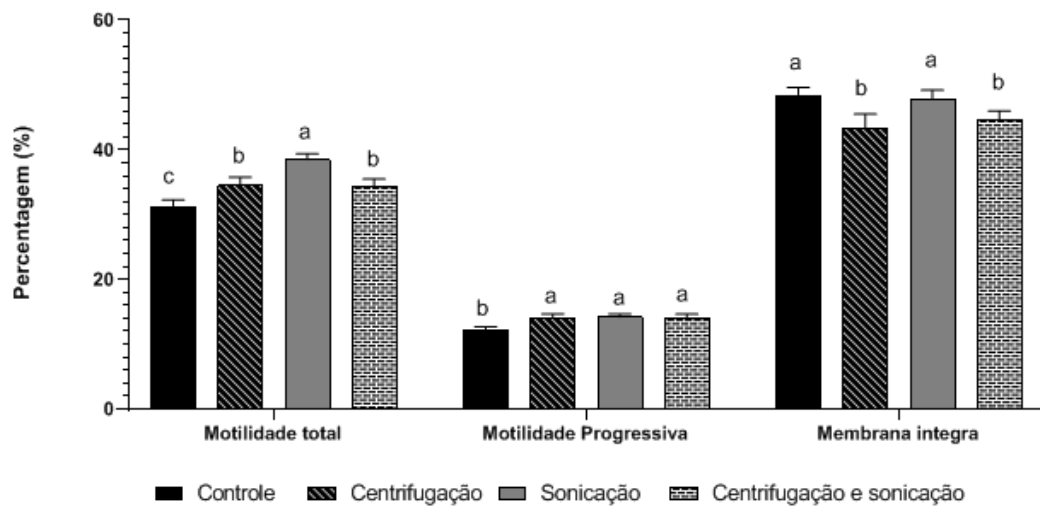


Figura 1 – Motilidade total e progressiva e membrana íntegra após o congelamento nos diferentes diluentes. Letras diferente na variável demonstram diferença estatística pelo teste Tukey ($P < 0.05$)

3 Considerações Finais

O tratamento de sonicação a fim de diminuir o tamanho das lipoproteínas de baixa densidade para melhor incorporação das moléculas na célula espermática equina, demonstraram resultados promissores em relação a motilidade, assim este tratamento pode ser aprimorado de forma que seja amplamente utilizado na rotina de congelamento de sêmen equino, otimizando o resultado dos rebanhos.

Referências

ABISMAIL, B.; CANSELIER, J. P.; WILHELM, A. M.; DELMAS, H.; GOURDON, C. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.6, n.1-2, p.75-83, 1999.

AMIRAT, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, J. L.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v.61, n.5, p.895-907, 2004.

ASSIS, L. M. D.; ZAVAREZE, E. D. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. D. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, p.99-109, 2012.

BALBUS, J. M.; FLORINI, K.; DENISON, R. A.; WALSH, S. A. Getting it right the first time: developing nanotechnology while protecting workers, public health, and the environment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1076, p.331-342, 2006.

BARKER, C. A.; GANDIER, J. C. Pregnancy In A Mare Resulting From Frozen Epididymal Spermatozoa. **Canadian journal of comparative medicine and veterinary science**, v.21, n.2, p.47-51, 1957.

BENCHARIF, D.; AMIRAT-BRIAND, L.; GARAND, A.; ANTON, M.; SCHMITT, E.; DESHERCES, S.; DELHOMME, G.; LANGLOIS, M. L.; BARRIERE, P.; DESTRUMELLE, S.; VERA-MUNOZ, O.; TAINURIER, D. Freezing canine sperm: comparison of semen extenders containing Equex and LDL (Low Density Lipoproteins). **Animal Reproduction Science**, v.119, n.3-4, p.305-313, 2010.

BERGERON, A.; CRETE, M. H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of reproduction**, v.70, n.3, p.708-717, 2004.

BRANDÃO, A. C. Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozóides criopreservados de eqüinos. 2008.

87 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; DA SILVA, E. C.; CARVALHO, G. R.; GUIMARÃES, J. D.; LIMA, A. L. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v.6, n.3, p.389-398, 2008.

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2013. 104 p.

CHAU, C.-F.; WU, S.-H.; YEN, G.-C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, n.5, p.269-280, 2007.

CORCINI, C. D.; GOULARTE, K. L.; BONGALHARDO, D. C.; LUCIA, T., JR.; JARDIM, R. D.; VARELA JUNIOR, A. S. Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. **Andrologia**, v.48, n.1, p.114-115, 2016.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v.12, n.1, p.62-76, 2011.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v.24, n.1, p.42-52, 1987.

GUERRA, P. J. Brasil tem o quarto maior rebanho equino do mundo, com 5,8 milhões de cabeça. **Conselho Federal de Medicina Veterinária**, 16 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.cfmv.org.br/portal/noticia.php?cod=606>>. Acesso em: 15 set. 2020.

HARRISON, R.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, n.1, p.343-352, 1990.

HE, S.; WOODS III, L. C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiology**, v.48, n.3, p.254-262, 2004.

HU, J.-H.; LI, Q.-W.; LI, G.; CHEN, X.-Y.; HAI-YANG, H.-Y.; ZHANG, S.-S.; WANG, L.-Q. The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low density lipoproteins. **Asian-australasian journal of animal sciences**, v.19, n.4, p.486-494, 2006.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, v.10, n.2, p.156-165, 1994.

KAWAMOTO, A.; OHASHI, K.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L. Q.; AZUMA, C.; MURATA, Y. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and sterility**, v.71, n.3, p.497-501, 1999.

KENTISH, S.; WOOSTER, T.; ASHOKKUMAR, M.; BALACHANDRAN, S.; MAWSON, R.; SIMONS, L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.9, n.2, p.170-175, 2008.

LIMA, R. A. D. S.; OLIVEIRA, R. A. D.; MENDES, C. Q. Perfil e tendências da equideocultura brasileira. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49. 2012, Brasília. **Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia: A produção animal no mundo em transformação**. Brasília: Sociedade Brasileira de Zootecnia 2012. p.1-19.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo no Brasil**. Piracicaba: CEPEA/ESALQ/USP, 2006. 250 p. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/documentos/texto/estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo-a-relatorio-completo.aspx>. Acesso em: 16 set. 2020.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.22, n.3, p.663-676, 2006.

MACIAS GARCIA, B.; GONZALEZ FERNANDEZ, L.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; MORILLO RODRIGUEZ, A.; GALLARDO BOLANOS, J. M.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; MORCUENDE, D.; PENA, F. J. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, n.5, p.811-818, 2011.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MENARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of reproduction**, v.67, n.4, p.1250-1258, 2002.

MOUSSA, M.; MARINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57, n.6, p.1695-1706, 2002.

MUKHERJEE, S.; RAY, S.; THAKUR, R. S. Design and evaluation of itraconazole loaded solid lipid nanoparticulate system for improving the antifungal therapy. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.22, n.2, p.131-138, 2009.

NILSSON, L.; OSMARK, P.; FERNANDEZ, C.; ANDERSSON, M.; BERGENSTAHL, B. Competitive adsorption of water soluble plasma proteins from egg yolk at the oil/water interface. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.18, p.6881-6887, 2006.

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

PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of animal science**, v.39, n.6, p.1144-1149, 1974.

PENG, J.; DONG, W. J.; LI, L.; XU, J. M.; JIN, D. J.; XIA, X. J.; LIU, Y. L. Effect of high-pressure homogenization preparation on mean globule size and large-diameter tail of oil-in-water injectable emulsions. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.23, n.4, p.828-835, 2015.

PICKETT, B.; AMANN, R. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A. O. e VOSS, J. L. (ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.769-789.

PILLET, E.; DUCHAMP, G.; BATELLIER, F.; BEAUMAL, V.; ANTON, M.; DESHERCES, S.; SCHMITT, E.; MAGISTRINI, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v.75, n.1, p.105-114, 2011.

PRAPAIWAN, N.; THARASANIT, T.; PUNJACHAIPORNPOL, S.; YAMTANG, D.; ROONGSITTHICHAI, A.; MOONARMART, W.; KAEOKET, K.; MANEE-IN, S. Low-

density Lipoprotein Improves Motility and Plasma Membrane Integrity of Cryopreserved Canine Epididymal Spermatozoa. **Asian-australasian journal of animal sciences**, v.29, n.5, p.646-651, 2016.

SQUEFF FILHO, J.; CORCINI, C. D.; SANTOS, F. C. C.; ANCIUTI, A. N.; GATTI, N. L. S.; ANASTACIO, E.; MIELKE, R.; NOGUEIRA, C. E. W.; CURCIO, B. R.; VARELA, A. S. J. Quercetin in equine frozen semen. **Cryo Letters**, v.38, n.4, p.299-304, 2017.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, 1999.

TOSIC, J.; WALTON, A. Effect of egg-yolk and its constituents on the respiration and fertilizing capacity of spermatozoa. **The Journal of Agricultural Science**, v.37, n.1, p.69-76, 1947.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.149-179, 2002.