

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

MICHELI PATRÍCIA RODRIGUES DE LIMA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE BHT NA QUALIDADE DO SÊMEN
REFRIGERADO DE COELHOS**

**FLORIANÓPOLIS - SC
2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

MICHELI PATRÍCIA RODRIGUES DE LIMA

**EFEITO DA ADIÇÃO DE BHT NA QUALIDADE DO SÊMEN
REFRIGERADO DE COELHOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência para obtenção do Diploma de Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Zaluski

**FLORIANÓPOLIS - SC
2024**

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC. Dados inseridos pelo próprio autor.

Patrícia Rodrigues de Lima, Micheli
EFEITO DA ADIÇÃO DE BHT NA QUALIDADE DO SÊMEN
REFRIGERADO DE COELHOS / Micheli Patrícia Rodrigues de
Lima ; orientador, Rodrigo Zaluski, 2024.
44 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. Antioxidante. 3. BHT. 4. Qualidade Seminal. I. Zaluski, Rodrigo . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Zootecnia. III. Título.

Micheli Patrícia Rodrigues de Lima

EFEITO DA ADIÇÃO DE BHT NA QUALIDADE DO SÊMEN REFRIGERADO DE COELHOS

Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 10 de junho de 2024.

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente
Rodrigo Zaluski
Data: 21/06/2024 12:30:37-0300
CPF: ***.924.089-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Rodrigo Zaluski

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
Priscila de Oliveira Moraes
Data: 21/06/2024 12:44:06-0300
CPF: ***.602.350-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof.ª Dr.ª Priscila de Oliveira Moraes

Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente
VIVIAN ALMEIDA KOSLOWSKI
Data: 21/06/2024 13:13:43-0300
CPF: ***.015.240-**
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Eng.ª Agr.ª Vivian Almeida Koslowski

Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus agradecimentos a todos que estiveram ao meu lado durante esta jornada, tornando possível a conclusão deste ciclo.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer imensamente aos meus pais, Renato Rodrigues de Lima e Patrícia Alice Correa Rodrigues de Lima, por todo o apoio, conversas, amor e constante encorajamento. Obrigada por estarem sempre lá quando precisei e por continuarem a me apoiar em cada etapa deste caminho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, expresso minha gratidão por proporcionar o ambiente propício para o meu desenvolvimento acadêmico, pela oportunidade de aprendizado e crescimento que a instituição me proporcionou.

Ao meu orientador e a minha coorientadora, expresso minha profunda gratidão por sua orientação, apoio e dedicação ao longo deste trabalho. Agradeço por aceitarem embarcar nesta jornada comigo, cada um em sua respectiva fase, e por compartilharem seu conhecimento e experiência, contribuindo significativamente para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Ao meu namorado, por todo o apoio nos altos e baixos desta jornada, meu sincero agradecimento. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos difíceis, por me incentivar nos momentos de dúvida e por ser meu companheiro de jornada, sempre presente e apoiador.

A Froy, por suas risadas, conversas, conselhos, obrigada por compartilhar não apenas seu tempo e esforço, mas também pela sua amizade e apoio incondicional.

As minhas amigas, em especial a Pingo, e às meninas do grupo “pãozinho de goiaba”, Camila, Marcell e Thayná, agradeço estarem comigo na reta final.

Agradeço também às pessoas que me auxiliaram durante a pesquisa, Ana, Camila e Priscila, pelo suporte e colaboração, que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos os que de alguma forma contribuíram para este projeto. Este momento não seria possível sem a presença e apoio de cada um de vocês.

RESUMO

Na conservação do sêmen de coelhos em baixas temperaturas o plasma seminal não fornece a proteção necessária para os espermatozoides contra as mudanças de temperatura. A adição de antioxidantes, como o hidroxitolueno butilado (BHT), aos diluidores comerciais tem demonstrado efeitos positivos para mitigar o efeito do armazenamento na qualidade seminal durante o armazenamento. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a eficiência do BHT adicionado ao diluente comercial na motilidade e vigor do sêmen de coelhos mantido sobre refrigeração por até 72 horas. Para isso, foram utilizados 20 machos da raça Nova Zelândia Branco com oito meses de idade e um peso médio de 4 kg. Os animais foram previamente treinados para a coleta de sêmen com o auxílio de uma vagina artificial. Para o estudo foi realizada a coleta de sêmen com formação de um *pool*, seguida da diluição do material utilizando diluente comercial (BotuSemen[®]) na proporção de 1:1. O antioxidante foi previamente adicionado ao diluente comercial formando os seguintes tratamentos: T0 – sem antioxidante; T1 - 0,5 mmol/mL BHT; T2 - 1,0 mmol/mL BHT; T3 - 2,0 mmol/mL BHT. O material foi refrigerado a 7°C e a motilidade e vigor seminal foi analisada nos tempos: 0, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância e teste de Tukey ou teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, adotando um nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram que a adição de BHT na concentração de 0,5 mmol/mL, foi capaz de manter a motilidade seminal em 48,7% por até 24 horas, diferindo significativamente do controle e dos demais tratamentos. Em relação ao vigor não houve alteração significativa, sendo observada redução progressiva desse parâmetro em todos os tratamentos no decorrer do tempo. Como conclusão geral, o BHT apresenta resultados satisfatórios para manutenção da motilidade do sêmen de coelhos armazenado em refrigeração na dose de 0,5 mmol/mL de diluente comercial.

Palavras-chave: Antioxidante. BHT. Qualidade Seminal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do rebanho de coelhos no Brasil	4
Figura 2. Principais raças de coelhos criadas no Brasil: Nova Zelândia Branco (A), Califórnia (B), Chinchila (C), Rex (D) e Azul de Viena (E)	5
Figura 3. Fração gel do ejaculado encontrado no sêmen de coelho.....	8
Figura 4. Aspectos do sêmen de coelho.....	9
Figura 5. Morfologia do espermatozoide.	10
Figura 6. Formação de ERO durante a cadeia de transporte de elétrons	12
Figura 7. Anormalidades do espermatozoide.....	11
Figura 8. Vagina Artificial (A) e manequim sendo utilizado para coleta de sêmen (B).....	16
Figura 9. Resumo esquemático da metodologia do projeto.	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Motilidade de espermatozoides (em %) coletados de coelhos e mantidos sobre refrigeração (7°C), utilizando diferentes doses de BHT e avaliados em diferentes tempos..... 18

Tabela 2. Vigor de espermatozoides de coelhos mantidos sobre refrigeração (7°C), utilizando diferentes doses de BHT e avaliados em diferentes tempos..... 20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHT – Hidroxitolueno Butilado

°C – Graus Celsius

DMF – N, N-dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

IA – Inseminação Artificial

mmol – Milimol

mL - Mililitro

MOT – Porcentagem de espermatozoides móveis

VA – Vagina artificial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Geral	3
2.2. Específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Cunicultura no Brasil	4
3.2. Maturação reprodutiva dos animais.....	5
3.3. Vantagens da coleta e armazenamento do sêmen na cunicultura.....	6
3.4. Características do sêmen de coelho.....	7
3.4.1. Plasma.....	7
3.4.2. Gel	8
3.4.3. Cor e aspecto do sêmen.....	8
3.4.4. Concentração espermática.....	9
3.4.5. Motilidade.....	9
3.5. Espermatozoides	10
3.5.1. Anormalidades do espermatozoide.....	11
3.5.2. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) no Espermatozoide	12
3.6. Preservação do sêmen cunícula.....	13
3.7. Diluentes	13
3.8. Antioxidantes na qualidade seminal.....	14
4. METODOLOGIA	15
4.1. Procedimentos de Coleta de Sêmen e Montagem dos <i>Pools</i>	15
4.2. Análises	17
4.3.1 Análise estatística.....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
6. CONCLUSÃO	21

	X
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
ANEXO 1.....	30

1. INTRODUÇÃO

Os coelhos são animais importantes tanto para a produção econômica, quanto para as áreas das ciências biomédicas. São utilizados como fonte de carne, pele, pelos, produção de anticorpos e outros bioprodutos. Com o avanço da genética, várias raças de coelhos começaram a ser desenvolvidas, com o intuito de promover o incremento de características desejáveis nas próximas gerações. Com isso, esses animais se tornaram valiosos para produção e pesquisas sendo essencial a preservação de algumas linhagens (Mazur *et al.*, 2008).

Além da preservação das linhagens, a comercialização de sêmen através da refrigeração tende a ser uma forma viável de lucro dentro da produção comercial. Isso se deve ao incremento do uso da inseminação artificial possibilitando a seleção de características de interesse, aumento da fertilidade em épocas estacionais, controle sanitário e importante forma de evitar a endogamia em pequenas granjas (Andrade *et al.*, 2008).

Um dos desafios da inseminação artificial na cunicultura é devido a necessidade desta técnica ser realizada com sêmen fresco de coelhos. Isso ocorre porque a qualidade do sêmen de coelho é prejudicada durante o armazenamento. Espermatozoides de coelhos são mais sensíveis a soluções hipertônicas, causando uma redução na capacidade de armazenamento e, conseqüentemente, uma diminuição nas taxas de sobrevivência (Seleem *et al.*, 2005).

O processo de resfriamento do esperma leva a danos celulares na membrana, citoplasma e estruturas do genoma, causados por estresse osmótico, choque frio, formação de cristais de gelo intracelular e produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (Amidi *et al.*, 2016).

O plasma seminal não fornece sozinho a proteção necessária para os espermatozoides contra as mudanças de temperatura na preservação em baixas temperaturas. Assim, para realizar a conservação do sêmen em baixas temperaturas é necessário fazer uso de diluidores, substâncias que tem efeito tampão e capacidade de proteção dos gametas durante o processo de refrigeração ou congelamento, além de fornecer energia (Nabi *et al.*, 2016).

Estudos tem demonstrado que diluentes comerciais apresentam eficiência no armazenamento de sêmen de coelho em baixas temperaturas (Domingo *et al.*, 2019; Andrade *et al.*, 2008). Oliveira *et al.* (2023), observaram que os diluentes comerciais BotuDog[®] e BotuSemen[®] foram eficientes para a conservação da qualidade seminal de coelhos em temperaturas de 5°C por até 48 horas.

O hidroxitolueno butilado (BHT) é um antioxidante fenólico sintético, avaliado em estudos como um aditivo em diluentes de sêmen apresentando efeitos benéficos para a concentração, motilidade e viabilidade das células espermáticas em bovinos, búfalos, cães e suínos (Khumran *et al.*, 2015; Neagu *et al.*, 2010; Trzcinska *et al.*, 2015).

O BHT é um análogo sintético da vitamina E, que funciona reduzindo os radicais de oxigênio e interrompendo o desenvolvimento dos processos de oxidação. O BHT é lipossolúvel o que possibilita a sua capacidade de atuação como antioxidante dentro e fora da membrana espermática, com possível efeito benéfico na conservação do sêmen de coelhos.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a eficiência do hidroxitolueno butilado (BHT) adicionado a diluente comercial na motilidade e vigor do sêmen de coelhos mantido sobre refrigeração por até 72h.

2.2. Específicos

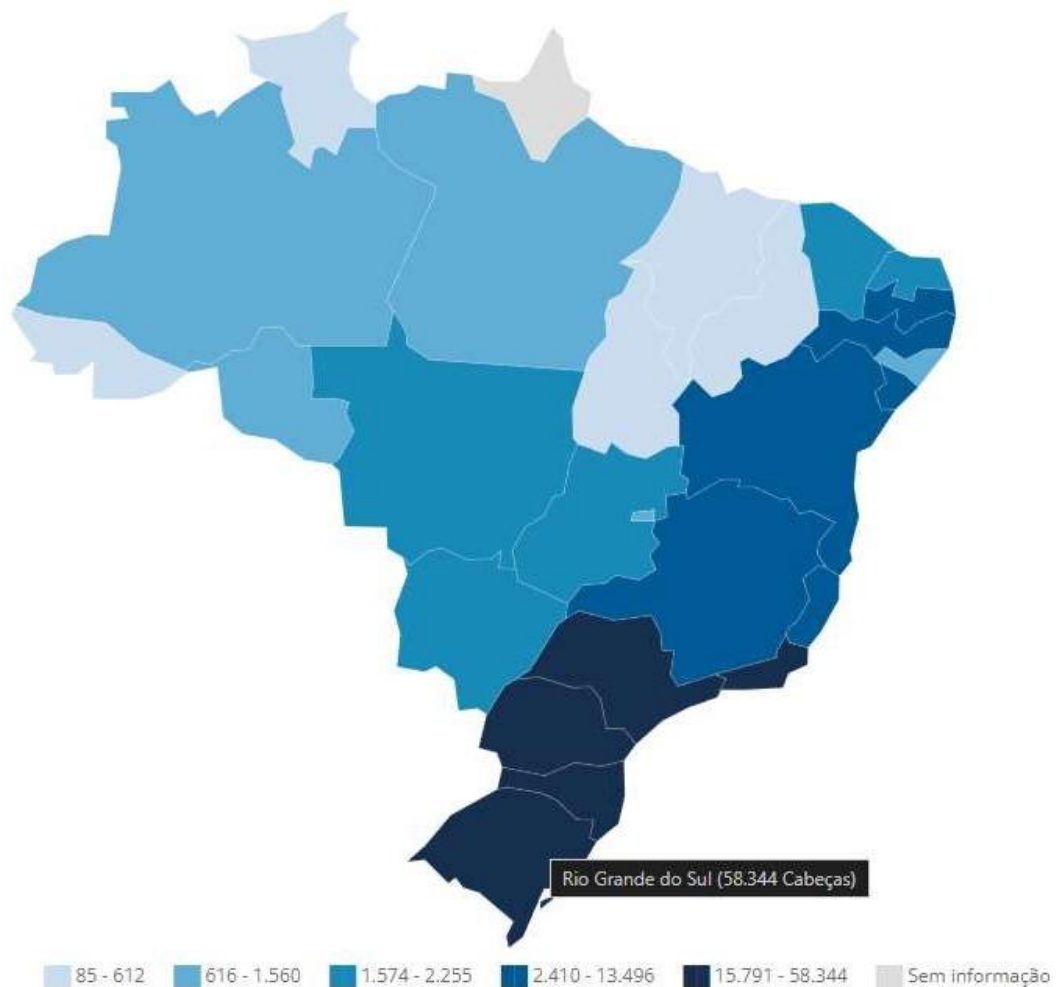
- Analisar diferentes concentrações de BHT (0,5; 1,0 e 2,0 mmol/ mL) adicionado ao diluente comercial BotuSemen®.
- Mensurar a motilidade e vigor dos espermatozoides armazenados sobre refrigeração nos tempos 4h, 8h, 12h, 24h, 48h e 72h.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cunicultura no Brasil

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2022) no ano de 2017 a produção de coelhos no Brasil atingiu 200.345 cabeças (Figura 1), com um total de 16.095 estabelecimentos. O Rio Grande do Sul é o maior produtor, com 58.344 cabeças, seguido por Santa Catarina e Paraná com 37.478 e 23.625 cabeças, respectivamente.

Figura 1. Mapa do rebanho de coelhos no Brasil

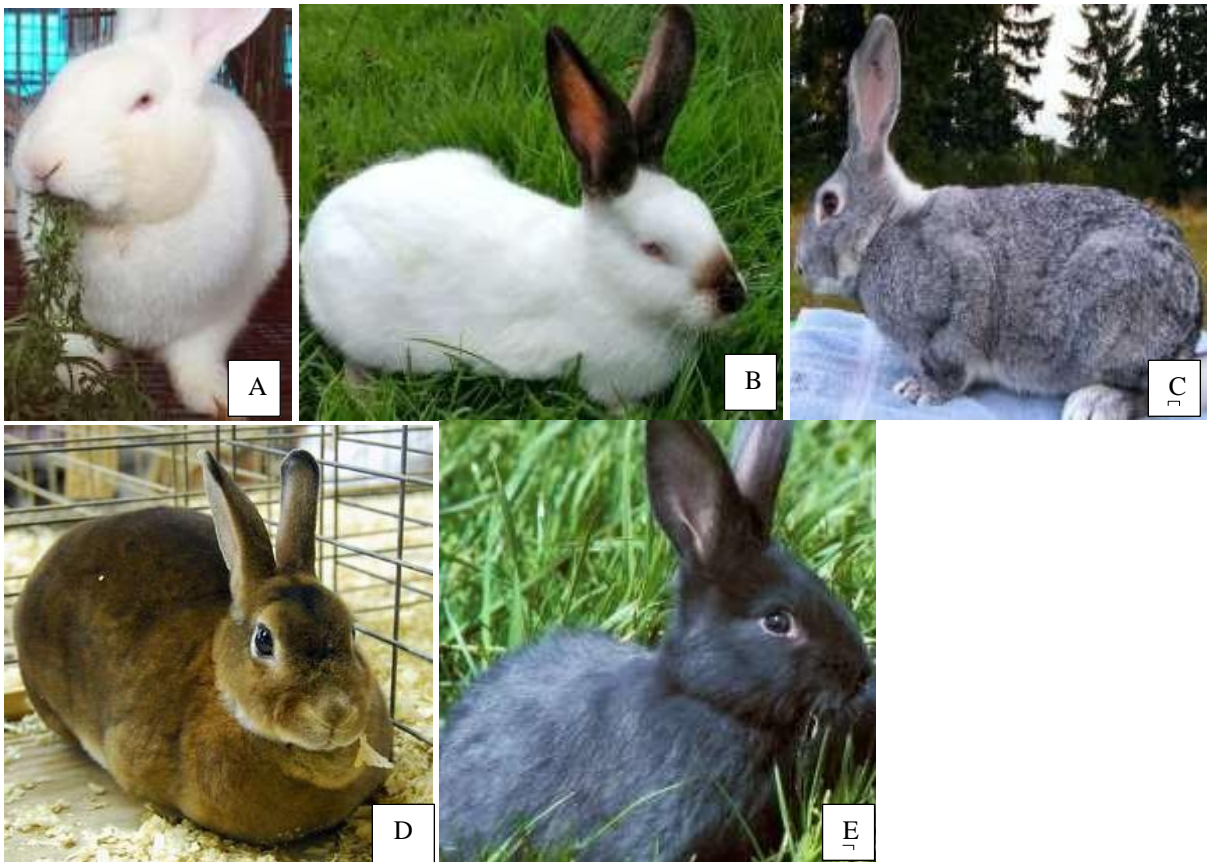


Fonte: IBGE, 2022.

Segundo Faria et al. (2008) as principais raças de coelhos criadas no Brasil são a Nova Zelândia Branco, Califórnia, Chinchila, Rex e a Azul de Viena (Figura 2).

A raça Nova Zelândia é uma raça de origem americana que pode atingir cerca de 5 kg quando adultos, são animais prolíficos, precoces e com excelente acabamento de carcaça. Já a raça Califórnia e a Chinchila apresentam excelente qualidade de pele e atingem cerca de 4,5 kg na idade adulta; a raça Chinchila aceita o cruzamento entre raças, principalmente com a Nova Zelândia. Embora a qualidade de pele da Califórnia seja boa, a raça Rex é que detêm o maior valor de venda de pele, superando o valor da carne do animal. A raça Azul de Viena é uma raça que pode atingir 5,5 kg, sendo uma das raças mais pesadas, apresentando uma boa produção de carne (Buscar Rural, 2022).

Figura 2. Principais raças de coelhos criadas no Brasil: Nova Zelândia Branco (A), Califórnia (B), Chinchila (C), Rex (D) e Azul de Viena (E)



Fonte: (A) Coelhário UFSC, 2019; (B) Coelhos Blogs, 2011; (C) PetVale, 2015; (D) Coelhos Blogs, 2011; (E) Coelhos Blogs, 2011.

3.2. Maturação reprodutiva dos animais

A fisiologia anatômica do macho tem efeito direto sobre a reprodução, afetando a qualidade seminal, sendo fundamental que os coelhos do sexo masculino apresentem aparelho reprodutivo bem desenvolvido, com ambos os testículos (Alago, 2013).

A maturidade sexual do macho é alcançada no momento em que a produção de espermatozoides estabiliza, podendo variar de acordo com a raça e o peso corporal, geralmente ocorrendo quando o animal apresenta 70% do peso adulto da raça. Cerca de 70 dias após o nascimento os animais já apresentam comportamento sexual com tentativas de monta, entretanto, é recomendado que os machos sejam utilizados para monta a partir de 150 dias (Carluccio *et al.*, 2010).

A produção espermática diária é de aproximadamente 150 a 300 milhões de espermatozoides/mL, tendo a diminuir conforme o ritmo de ejaculações (Oshio *et al.*, 1986). Segundo Alvariño (2000) a partir do terceiro ejaculado, o volume e concentração espermática tende a reduzir. Esses resultados foram confirmados por Mocé & Vicente (2009) que demonstraram que o segundo ejaculado apresenta qualidade semelhante ao primeiro, por vezes melhores, por conta da diminuição do gel, desde que seja respeitado um intervalo de 15 minutos entre as coletas.

3.3. Vantagens da coleta e armazenamento do sêmen na cunicultura

A produção brasileira de coelhos é pequena quando comparada às demais criações, já estabelecidas e consolidadas no mercado, incluindo aves, bovinos e suínos. Geralmente esse tipo de produção é realizada em pequenas criações, com um número reduzido de machos e um número grande de fêmeas, onde o ejaculado de um macho de coelho, pode inseminar até dez fêmeas (Ferreira *et al.*, 2012). Esse fator pode gerar endogamia, busca de empréstimo de coelhos de outras granjas que podem facilitar a disseminação de doenças infecciosas; ou no aumento de custos, devido à manutenção de maior número de machos apenas para a reprodução.

Na cunicultura a coleta de sêmen em coelhos maduros sexualmente pode ser realizada utilizando uma vagina artificial (VA) acoplada a um tubo de ensaio para armazenar o ejaculado. O instrumento deve ser posicionado embaixo de um manequim com uma pele de coelha e levado até a gaiola do macho para realizar a coleta do sêmen, mantendo a temperatura média da VA em aproximadamente 45°C para estimular a ejaculação (Carluccio *et al.*, 2010).

A coleta, adequado armazenamento e utilização do material genético dos machos proporciona diversas vantagens para a produção animal, incluindo a venda do sêmen de animais premiados em competições. O sêmen recém-coletado pode ser utilizado na técnica de inseminação artificial (IA). Dentre as vantagens proporciona melhores resultados que a monta

natural, reduz problemas sanitários, depressão endogâmica da produção, possibilita a realização de testes de progênie e programas de controle zootécnicos, e introdução de genes superiores nos rebanhos com um menor risco sanitário (Maes *et al.*, 2008; Nishijima *et al.*, 2021).

3.4. Características do sêmen de coelho

O sêmen é um fluido reprodutivo masculino que consiste em uma suspensão celular líquida, composta por espermatozoides. É constituído por duas partes principais, a porção fluida (plasma) e a porção gelatinosa ou fração gel (Mukherjee *et al.*, 1951).

As características seminais dependem de diversos fatores que podem influenciar na qualidade do sêmen coletado, incluindo a idade do animal, genética, clima, variação de temperatura, luminosidade, frequência da coleta e manejo alimentar (Nizza *et al.* 2003; Castellini, 2008).

3.4.1. Plasma

Segundo Hafez e Hafez (2004) o plasma é a parte fluida presente na suspensão ejaculatória, adicionada no momento da ejaculação do animal e tem como principal função o transporte dos espermatozoides pelo trato genital masculino. Além disso, o plasma ativa a motilidade e fornece ambiente propício para a sobrevivência dos gametas masculinos após a sua deposição no trato reprodutivo feminino (Evans & Maxwell, 1990).

O plasma seminal é composto por carboidratos, proteínas, lipídios e minerais como sódio, potássio, magnésio, selênio e zinco (Castellini *et al.*, 2007; Gliozzi *et al.*, 2009). Os componentes do plasma cumprem importantes funções no metabolismo espermático, como a frutose que proporciona um ambiente adequado para suprir e manter o metabolismo do espermatozoide (Mann, 1945).

A próstata do coelho produz e secreta um grande número de grânulos chamados de vesículas ou prostassomas, também encontrado em humanos. Essas vesículas variam de 0,5 a 4 µm e entre as suas funções está a proteção contra o estresse oxidativo e a promoção da motilidade dos espermatozoides (Mourvaki *et al.*, 2010).

3.4.2. Gel

O gel é o produto resultante das glândulas vesiculares, podendo variar sua consistência, de viscoso a gelificado, de acordo com a quantidade dos componentes (Figura 3) (Holtz et al, 1978). A fração gel é composta por ácido cítrico e frutose (Parsons, 1950; Mukherjee *et al.*, 1951).

Embora a fração gel do ejaculado seja comumente encontrado no sêmen de coelho, estudos relatam não ter nenhuma função, além de prevenir a perda dos espermatozoides após a ejaculação, presumindo que a fração gel do sêmen de roedores funcione como um sistema de tampão natural (Mukherjee *et al.*, 1951; Quesenberry *et al.*, 2004; Alencar, 2015). Com isso, recomenda-se que a fração gel seja descartada após a coleta de sêmen, antes que sejam realizados os testes de análise de qualidade seminal (IRRG, 2005).

Figura 3. Fração gel do ejaculado encontrado no sêmen de coelho



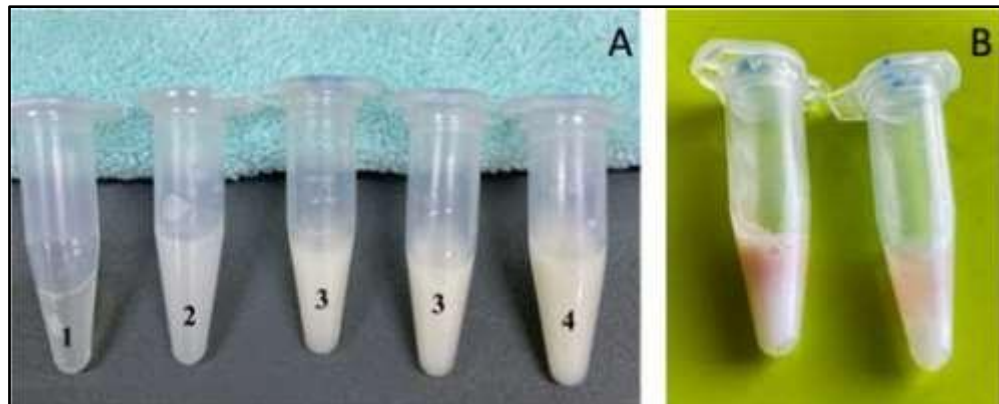
Fonte: Autorial própria, 2023.

3.4.3. Cor e aspecto do sêmen

A cor pode ser usada como uma primeira estimativa referente à qualidade do sêmen, conforme apresentado na Figura 4. Pode-se encontrar ejaculados de coloração e aspecto claro (1A), turvo (2A), leitoso (3A) e cremoso (4A), sendo o sêmen com aspecto leitoso a cremoso associados a um sêmen de boa qualidade, desde que não tenha presença de sangue ou urina. O sêmen com alta concentração espermática possui aspecto cremoso, enquanto a baixa concentração apresenta aspecto aquoso, podendo ser quase translúcido, indicando que não há uma taxa alta de espermatozoides no ejaculado (Arrebola & Fernandez, 2011). Na coleta artificial de sêmen, a coloração e o aspecto podem ser alterados pela presença de urina

associada à alta temperatura da vagina artificial, gerando uma secreção espermática amarelada; ou pela presença de células epiteliais advindas do tecido genital com uma coloração em tom cinza ou avermelhada que está ligada a presença de sangue (Figura 4B) (Chang, 1959; Castellini & Bosco, 1998).

Figura 4. Aspectos do sêmen de coelho.



Fonte: Kittima Lewchalermvong *et al.*, 2023.

3.4.4. Concentração espermática

A concentração de esperma em coelhos varia de 100 a 500×10^6 espermatozoides/ mL e apresenta mudanças de acordo com a raça, alimentação e idade (Campos *et al.*, 2012). O estímulo sexual sem a realização da cópula, realizado 1 a 2 minutos antes da coleta pode aumentar a variação da concentração (Lebas *et al.*, 1997).

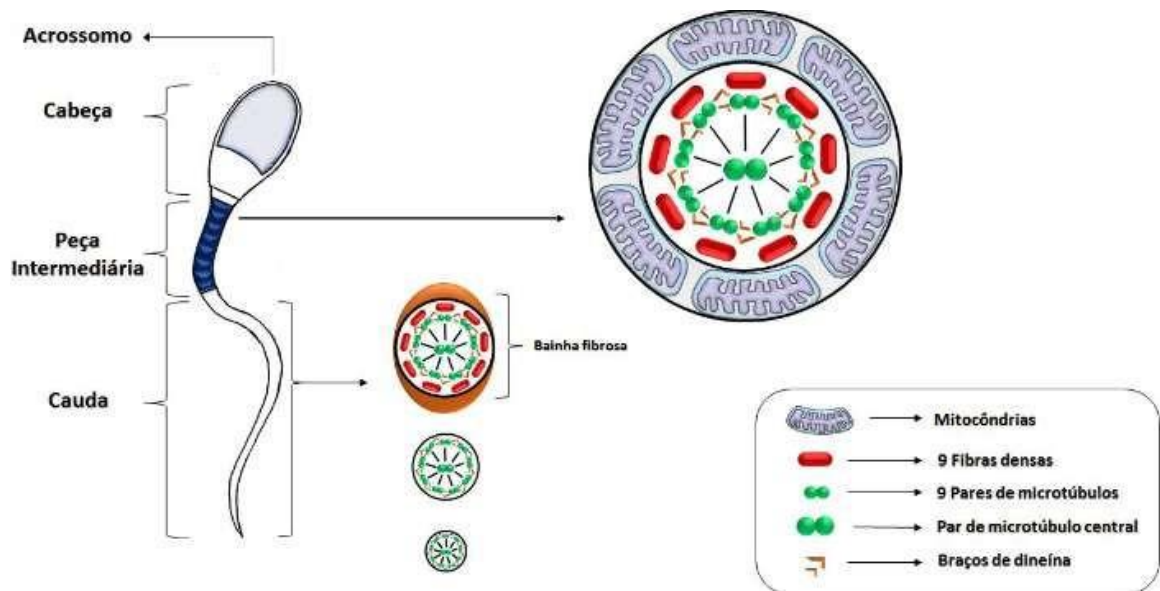
3.4.5. Motilidade

A motilidade é a determinação da proporção de espermatozoides móveis em um determinado campo do microscópio. Pode ser representada pela quantidade de espermatozoides em porcentagem que exibem um movimento progressivo em linha reta (Chrenek *et al.*, 2007, Lucini & Fukumoto, 2023). A avaliação é feita de forma visual e subjetiva logo após a coleta de sêmen (Shoae *et al.*, 2008; IRRG, 2005). Segundo Roca *et al.* (2005) a motilidade progressiva por ser classificada em porcentagem de 0 a 100%.

3.5. Espermatozoides

O espermatozoide é dividido morfológicamente em cabeça e cauda, estruturas que desempenham funções cruciais no processo de fertilização do óvulo. A cabeça contém o núcleo que abriga o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o acrossomo. O flagelo pode ser dividido em peça intermediária e cauda (Figura 5). A peça intermediária é rica em mitocôndrias responsáveis por grande parte da movimentação dos espermatozoides através da produção de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) e a cauda, associada a movimentação, é composta por microtúbulos, fibras densas, bainha fibrosa e mitocôndrias (Varner *et al.*, 2015; Brito *et al.*, 2007). Em coelhos o espermatozoide apresenta uma cabeça pequena e uma cauda longa e fina, o que torna sua estrutura mais sensível a danos físicos durante o congelamento e descongelamento (Campos *et al.*, 2012).

Figura 5. Morfologia do espermatozoide.



Fonte: Luis Fernando Mercês Chaves Silva, 2017.

O espermatozoide é envolvido pela membrana plasmática que atua como uma barreira física, protegendo-o do ambiente externo. Esta é constituída de uma bicamada de lipídeos e proteínas, principalmente, de ácidos graxos poli-insaturados que garantem a fluidez necessária para a sua movimentação durante o processo de fertilização.

Cabe salientar que na etapa final da espermatogênese e no trânsito do epidídimo a maioria das organelas e do citoplasma (retículo endoplasmático, ribossomos e aparelho de

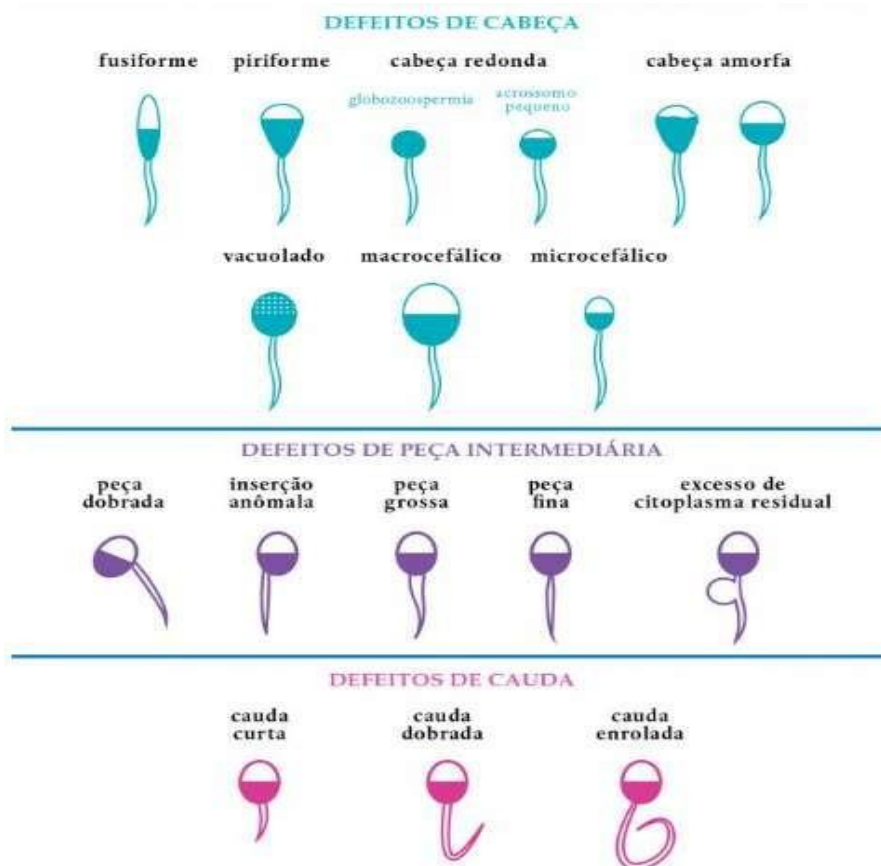
Golgi), é removida dos espermatozoides (Miller *et al.* 2010). Essa remoção acarreta a compactação do DNA e a aquisição da capacidade de movimento (Toshimori & Ito, 2003). As enzimas antioxidantes armazenadas no citoplasma também são removidas e o espermatozoide torna-se vulnerável ao estresse oxidativo, principalmente advindo das espécies reativas de oxigênio (ERO) (Aitken *et al.*, 2014).

3.5.1. Anormalidades do espermatozoide

Um espermatozoide de classificação morfológica normal deve apresentar cabeça lisa, peça intermediária regular, cauda com comprimento uniforme e mais fina que a peça intermediária (World Health Organization, 2010).

Estudo realizados por Gandini *et al.* (2000) constataram que as anormalidades do sêmen, está ligada diretamente ao aumento da fragmentação do DNA. Em geral, a parte mais afetada é a cabeça dos espermatozoides, embora, a cauda e a peça intermediária possam apresentar anormalidades, conforme demonstrado na Figura 7.

Figura 6. Anormalidades do espermatozoide

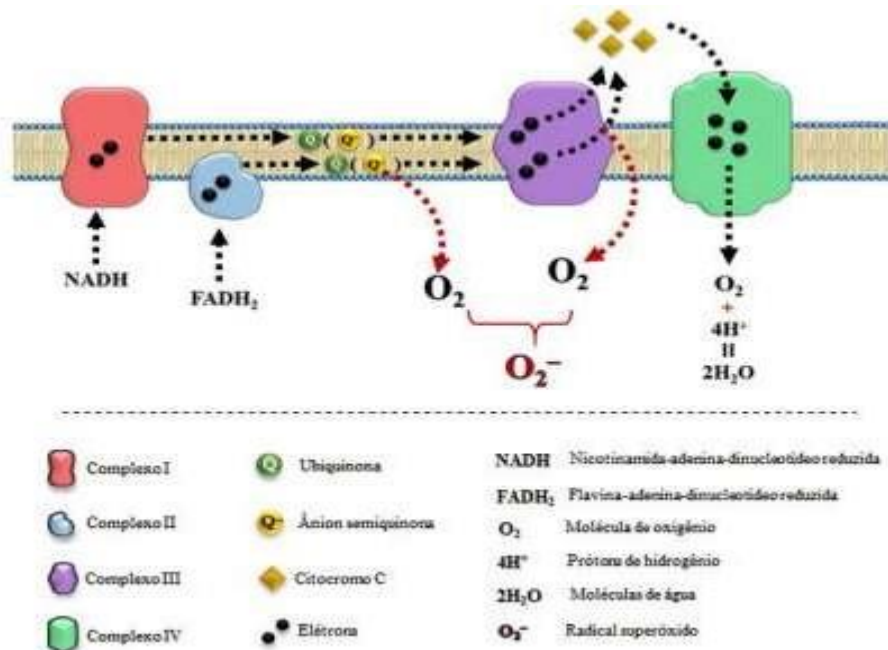


Fonte: IPGO Medicina da Reprodução, 2024.

3.5.2. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) no Espermatozoide

Ainda não está totalmente elucidado o mecanismo responsável pela produção de ERO no espermatozoide. A hipótese mais divulgada cientificamente é a presença de uma oxidase na membrana plasmática que, quando ativada, gera O_2^- . Lehninger et al. (2014) constataram que a mitocôndria é a principal fonte de ERO nos espermatozoides, gerando radicais livres em várias etapas do processo metabólico, principalmente na passagem de elétrons e ubiquinona, através de dois doadores diferentes nos complexos I (NADH: coenzima q redutase) e no complexo II ($FADH_2$) para o complexo III, liberando um radical intermediário Q^- , cedendo um elétron ao O_2 , levando a formação de um radical superóxido (O_2^-) (Figura 6).

Figura 6. Formação do ERO durante a cadeia de transporte de elétrons



Fonte: Luis Fernando Mercês Chaves Silva, 2017.

Segundo Ijaz et al. (2009) os espermatozoides contêm uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, tornando-os suscetíveis a formação das ERO. O plasma seminal possui antioxidantes endógenos (superóxido dismutase e glutatona peroxidase), que atuam na prevenção da criação dos ERO eliminando a formação dos radicais livres, porém as concentrações dos antioxidantes endógenos diminuem na refrigeração do sêmen, aumentando a concentração de radicais livres (Betancur *et al.*, 2012).

A criopreservação aumenta a geração de ERO por causar danos na membrana, já que o principal local de geração dessas moléculas ocorre na membrana levando a uma perda de

antioxidantes. Dessa forma, a adição de doses de antioxidantes no sêmen juntamente com a solução para congelamento pode ser uma alternativa para a redução dos ERO e consequentemente nos danos causados (Bansal & Bilaspuri, 2011).

3.6. Preservação do sêmen cunícula

A preservação dos espermatozoides em baixas temperaturas teve início com fins científicos por Lazaro Spallanzani, em 1776. Esse processo pode ocorrer por criopreservação na qual as células são conservadas em temperaturas negativas, com o objetivo de manter o potencial biológico da por um período de tempo indeterminado; ou por refrigeração que utiliza temperaturas que não atingem o ponto de congelamento (Pegg, 2002; Pesch & Bergmann, 2006; Saragusty, 2011). Contudo as técnicas de estocagem foram revitalizadas após a descoberta dos crioprotetores, tornando possível utilizar o material genético criopreservado para inseminação artificial (IA) (Holt, 2000).

Para se obter uma conservação eficiente dos espermatozoides deve-se utilizar diluentes, ter uma taxa de diluição, resfriamento e descongelamento adequados (Purdy, 2004). Os processos de congelar e descongelar o material genético resultam em danos celulares por conta das mudanças de temperatura, estresse osmótico, formações de cristais de gelo, lesão no DNA e alteração da membrana dos gametas masculinos (Parrish & Foote, 1986). As modificações que ocorrem nas membranas podem ser classificadas em primárias e secundárias, dependendo do seu fator de origem. As primárias são oriundas de cristais de gelo por causa do estresse térmico e as secundárias advindas das mudanças morfológicas dos lipídios das membranas pelo estresse osmótico (Pesch & Bergmann, 2006).

3.7. Diluentes

O plasma seminal não fornece sozinho a proteção necessária para os espermatozoides contra as mudanças de temperatura na criopreservação. Dessa forma, para realizar a conservação do sêmen em baixas temperaturas é necessário fazer uso de diluidores, substâncias com capacidade de proteção dos gametas que também fornecem energia e efeito tampão (Castellini, 1998; Nabi *et al.*, 2016).

Segundo pesquisas realizadas por Castellini e Bosco (1998) a preservação do material genético por meio de criogenia durava cerca de 2 horas em temperaturas de 4°C com a solução de TRIS, ovo, dimetilsulfóxido (DMSO). Os danos provocados pelo choque frio

podem ser diminuídos pela taxa de resfriamento ou materiais que estabilizam a membrana do espermatozoide, incluindo gema de ovo ou leite desnatado (Moc  & Vicente, 2009).

Domingo et al. (2019) constataram que o diluente INRA 96[®] suplementado com 6% de N, N-dimetilformamida (DMF)   superior ao glicerol, quando comparado em qualidade de espermatozoides íntegros dos coelhos após o processo de criogenia. A adi o de DMF manteve a integridade da membrana e a motilidade por 24 horas em 4 e 16 C (Domingo *et al.*, 2019)

Suárez et al. (2021) verificaram que diluentes produzidos com leite desnatado e a o ar ou diluentes de caseinatos de sódio, fosfato e a o ar são alternativas eficientes na conserva o da qualidade do s men por até 72 horas em temperatura de 16 C.

Oliveira *et al.* (2008) concluíram que os diluidores BotuDog[®] e BotuSemen[®] permitem melhor conserva o do material genético de coelhos machos em temperaturas de 5 C em até 48 horas.

3.8. Antioxidantes na qualidade seminal

Durante o armazenamento em temperaturas refrigeradas, que variam de 4 a 17 C, os espermatozoides sofrem altera es que podem comprometer sua capacidade de fertiliza o. O armazenamento de líquido refrigerado reduz o metabolismo do esperma, mas não o det m completamente. Isto ocorre porque a 5 C, a bomba Na⁺/K⁺ não funciona adequadamente, aumentando a concentra o intracelular de Na⁺ (Gharagozlo *et al.*, 2011).

Além do efeito de resfriamento, a presença de espermatozoides mortos aumenta a forma o de espécies reativas ao oxig nio (ERO) diminuindo a qualidade do esperma durante a refrigera o (Allai *et al.*, 2018). Isso pode ser especialmente relevante no armazenamento prolongado em refrigera o líquida, quando a taxa de espermatozoides mortos aumenta com o tempo de armazenamento e ao usar diluidores   base de proteínas animais, como gema de ovo ou leite (Allai *et al.*, 2018).

O hidroxitolueno butilado (BHT)   um análogo sint tico da vitamina E, que funciona reduzindo os radicais de oxig nio e interrompendo o desenvolvimento dos processos de oxida o. O BHT   lipossolúvel o que possibilita a sua capacidade de atua o como antioxidante dentro e fora da membrana espermática.

O BHT   um antioxidante já avaliado em estudos como um aditivo em diluentes de s men, que apresentou efeitos benéficos para a concentra o, motilidade e viabilidade das células espermáticas em bovinos, búfalos, cães e suínos (Khumran *et al.*, 2015; Neagu *et al.*, 2010; Trzcinska *et al.*, 2015). O BHT também neutraliza as ERO nos arredores da membrana

plasmática e converte essas moléculas em hidroperóxidos (moléculas menos reativas), reduzindo o efeito prejudicial (Merino *et al.*, 2012).

4. METODOLOGIA

O experimento foi realizado após a aprovação do CEUA/UFSC, com protocolo nº 7242230923.

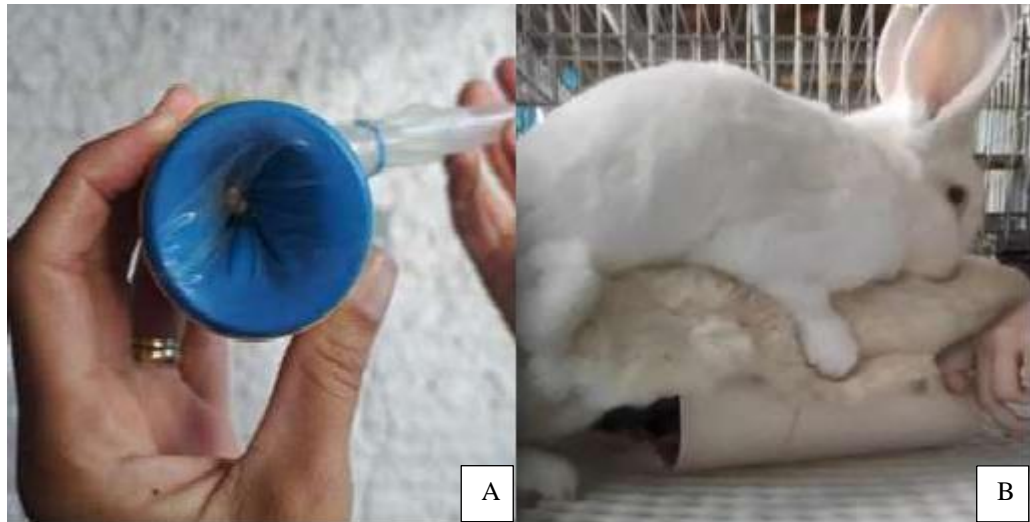
O estudo foi conduzido no Setor de Cunicultura da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, na Fazenda Experimental da Ressacada, tendo início no dia 12 de dezembro de 2023, com o treinamento dos animais. Durante o experimento foram utilizados 14 machos da raça nova Zelândia Branco provenientes do próprio coelhário da fazenda, com oito meses de idade, pesando em média 4 kg. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de arame galvanizado, tendo acesso à água à vontade por bebedouro tipo *nipple*, e alimentados uma vez ao dia, no período da manhã, com 100g de ração peletizada comercial para coelhos.

Os animais dispunham de canos de PVC como forma de enriquecimento ambiental e nos momentos mais quentes do dia foram colocadas garradas pets com água congelada sobre as gaiolas para reduzir a temperatura ambiente.

4.1. Procedimentos de Coleta de Sêmen e Montagem dos *Pools*

Para a coleta de sêmen, os machos foram treinados previamente utilizando uma vagina artificial e um manequim (figura 8) por um período de 30 dias, realizando uma coleta por semana. Os dados de coleta e padronização das análises desse período de padronização são descritos no Anexo 01.

Figura 7. Vagina Artificial (A) e manequim sendo utilizado para coleta de sêmen (B).

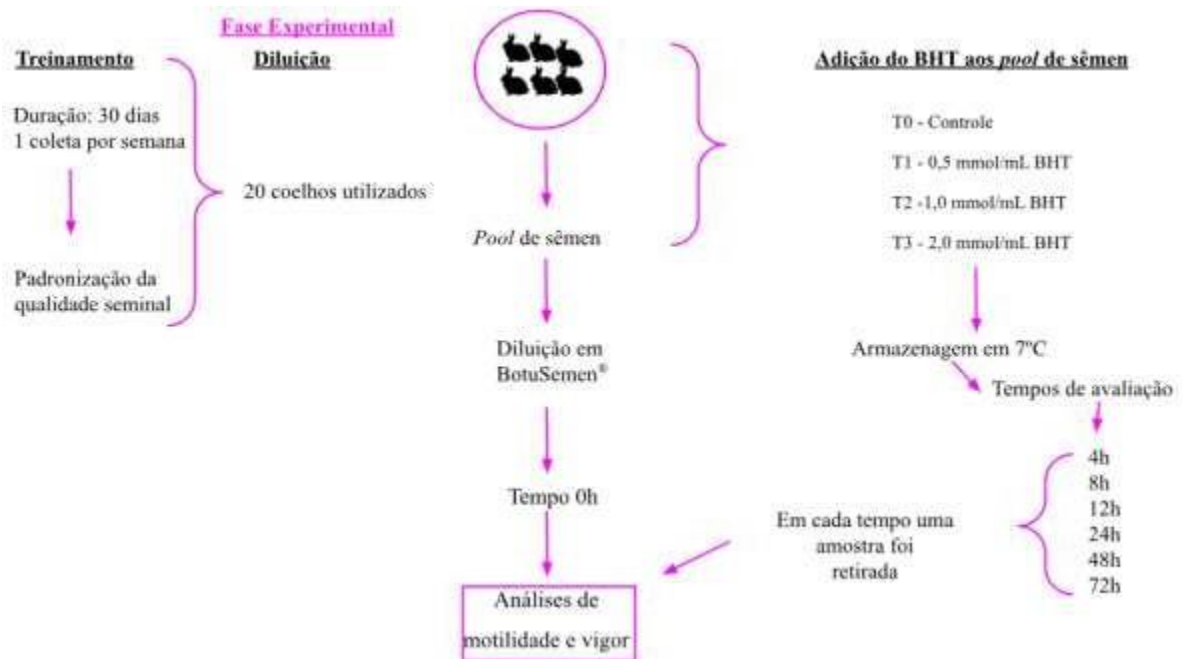


Fonte: Camila Kuster Xavier, 2023.

Para o procedimento experimental, as coletas de sêmen foram iniciadas pela manhã, utilizando dois manequins e duas vaginas artificiais para evitar grandes variações no tempo de coleta. O sêmen foi coletado aleatoriamente nos animais e armazenado em tubos Falcon mantidos em banho-maria para manter a temperatura (aproximadamente 34°C). Ao atingir um volume de aproximadamente 7 mL, foi realizada a remoção da fração gel do sêmen coletado individualmente nos animais e junção do material para formação de um *pool* necessário para realizar as análises. Para cada *pool* foi utilizado sêmen coletado em aproximadamente 06 animais.

Após a formação do *pool*, 1 mL de sêmen foi retirado e adicionado a um tubo contendo 1 mL do diluidor comercial de sêmen de equinos BotuSemen® ao qual já havia sido adicionado 0,5; 1,0; ou 2,0 Mmol de BHT por mL. A mistura de sêmen e BHT foi homogeneizada e imediatamente uma alíquota foi retirada para análise microscópica de motilidade e vigor dos espermatozoides. No tratamento controle, o sêmen foi diluído apenas com diluidor comercial, sem adição do BHT. Imediatamente após análise, as amostras foram transferidas em isopor refrigerado do coelhário para o laboratório multiusuário da Fazenda Experimental da Ressacada, onde foram mantidos em refrigeração média de 7°C até a realização das análises nos diferentes tempos. O processo de coleta de sêmen para a montagem dos *pools* foi realizado em quadruplicata (figura 9).

Figura 8. Resumo esquemático da metodologia do projeto.



Fonte: Autoria própria.

4.2. Análises

O sêmen dos animais foi analisado quanto à motilidade e vigor, nos tempos 0, 4, 8, 12, 24, 48 e 72h. A análise de motilidade avalia a quantidade de espermatozoides vivos em movimento; já a análise de vigor determina a qualidade da velocidade de progressão dos espermatozoides em escala de 0 a 5 (ALENCAR, 2015).

Nos tempos pré-determinados, o sêmen armazenado nos tubos com os diferentes tratamentos era retirado da geladeira, uma pequena alíquota era colocada sobre a lâmina e coberta por uma lamínula. Para que os espermatozoides saíssem da inércia da refrigeração, a amostra permanecia alguns segundos em temperatura ambiente e as análises eram realizadas com um microscópio óptico modelo Leica DM500.

4.3.1 Análise estatística

A unidade experimental neste estudo foi o *pool* do sêmen de coelhos, com a qualidade espermática previamente padronizada ao longo do treinamento e novamente verificada no tempo 0 de avaliação (após a diluição e adição do BHT). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições por tratamento, com parcelas subdivididas no tempo. Os dados de motilidade obtidos foram submetidos a uma

análise de variância (ANOVA) e médias analisadas por teste de Tukey a 5% de significância. Dados de vigor foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com 5% de significância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados dos efeitos dos tratamentos acrescidos de BHT sobre a motilidade seminal após a refrigeração estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Motilidade de espermatozoides (em %) coletados de coelhos e mantidos sobre refrigeração (7°C), utilizando diferentes doses de BHT e avaliados em diferentes tempos.

Tratamento/Tempo	0h	4h	8h	12h	24h	48h	72h
Controle (0,0 BHT)	66,2 ± 4,7 Aa	56,2 ± 17,9 Aa	53,7 ± 16 Aa	47 ± 11,9 ABa	27,5 ± 8,6 Bb	1,5 ± 1,0 Ca	0,0 Ca
T1 (0,5 mmol BHT)	62,5 ± 8,6 Aa	58,2 ± 6,2 Aa	57,5 ± 6,4 Aa	56,2 ± 6,2 Aa	48,7 ± 8,5 Aa	7,5 ± 6,2 Ba	0,2 ± 0,5 Ba
T2 (1,0 mmol BHT)	66,2 ± 4,7 Aa	62,5 ± 8,6 Aa	57,5 ± 8,6 ABa	54,5 ± 6,4 ABa	44,5 ± 6,4 Ba	5,7 ± 4,6 Ca	0,7 ± 0,9Ca
T3 (2,0 mmol BHT)	62,5 ± 5,0 Aa	58,7 ± 4,7 ABa	55,0 ± 7,0 BCa	50,7 ± 6,5 BCa	43,7 ± 4,7 Ca	2,0 ± 2,7 Da	0,2 ± 0,5Da

Dados apresentados em % (Médias ± Desvio Padrão). Letras maiúsculas demonstram comparação entre os tempos para cada tratamento. Letras minúsculas indicam comparação entre os tratamentos para cada tempo. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, ANOVA seguida do teste de Tukey a 5% de significância.

Pode-se observar que no tempo 0h a motilidade seminal não apresentou variações entre os tratamentos, demonstrando que todo sêmen apresentava boas características no início da avaliação variando entre 62 e 65% de motilidade. Os dados obtidos no presente estudo corroboram com resultados encontrados por Campos *et al.* (2012) que obteve 62,22% de motilidade no tempo zero de avaliação. Alvarez *et al.* encontrou valores de motilidade de 32,9% ao avaliar a adição de vitamina C ao sêmen de coelhos no tempo zero de avaliação. Valores de motilidade acima de 60% indicam boa qualidade seminal, sendo a motilidade um parâmetro que tende a variar de acordo com a idade do macho, o clima e o ambiente (Chrenek *et al.*, 2007).

A qualidade seminal apresentou estabilidade por um período de tempo maior, nos tratamentos com menores concentrações de BHT. Os resultados demonstram que o T1 com adição de 0,5 mmol de BHT mantêm a motilidade seminal em 48,7% por até 24h, diferindo significativamente ($p < 0,05$) do controle e das demais doses de adição de BHT. No tempo 48h a motilidade foi reduzida mesmo no T1, mas ainda manteve média de 7,5% diferindo do controle e das demais doses avaliadas.

Estudo realizados por Domingo et al. (2019) com a adição de DMF ao diluidor INRA 96® comprovou a manutenção da integridade da membrana, vigor e a motilidade dos espermatozoides (por 24 horas em temperaturas de 4 e 16°C). Nossos resultados mostram que o BHT pode substituir o DMF na preservação do sêmen quanto ao vigor, sendo uma alternativa mais barata e de fácil acesso, quando comparado ao DMF.

Estudo realizado por Araujo (2016) utilizou 0,5 mmol/BHT acrescido ao diluente BotuSemen® no sêmen de equinos, e obteve uma motilidade média de 42,2 % no tempo de 24 horas; e de 36,7 % no controle, também demonstrando melhora na qualidade do sêmen. Por ser um antioxidante lipossolúvel, o BHT tende a agir dentro e fora da membrana plasmática protegendo da criação das ERO durante a refrigeração. Nossos resultados corroboram com estudos realizados por Araujo (2016) que observou efeito semelhante, entretanto, trabalhando com a conservação do sêmen em nitrogênio líquido. Trabalho realizado por Herlon *et al.* (2018) com sêmen canino encontrou os melhores resultados utilizando 2,0 mmol/BHT com o diluidor ACP-106c. Dessa forma, pode-se inferir que existem mudanças na interação do BHT com diferentes diluentes, e os resultados na conservação do sêmen podem variar entre diferentes espécies.

Os dados do presente trabalho demonstram que as doses mais elevadas de BHT reduziram significativamente a motilidade com o passar do tempo, indicando possível efeito tóxico dessas doses para o sêmen de coelhos. Bansal *et al.* (2011) demonstraram que concentrações excessivas de antioxidantes aumentam a fluidez da membrana, tornando a interação tóxica e prejudicial a integridade, levando ao aumento da produção de radicais livres e ERO, diminuindo assim a capacidade fecundativa do espermatozoide por baixar a motilidade e o vigor.

A análise de vigor espermático realizada para cada tempo de avaliação demonstrou que não houve variação desse parâmetro nos tratamentos com inclusão de BHT ($P > 0,05$) (Tabela 2). Observa-se que os valores médios de viabilidade no tempo zero variaram de 2,00 a 1,50 e reduziram progressivamente no decorrer do tempo. Nossos valores iniciais de vigor diferem dos resultados encontrados por Campos *et al.* (2012), onde foram obtidos valores de

vigor 3 no tempo zero. Estudos realizados por Andrade *et al.* (2008) também diferiram ao encontrar resultados de 3,04 de vigor no sêmen fresco no tempo zero. A mensuração do vigor entre estudos podem diferir pois a determinação desse parâmetro é visual, onde cada avaliador pode estabelecer um parâmetro e uma forma de avaliar que diferem entre si, dificultando a comparação de resultados.

As variações nos tempos em refrigeração podem ocorrer em função do diluidor e do BHT não oferecerem proteção contra o choque térmico da refrigeração, sendo a queda do vigor uma característica comum quando a conservação do sêmen está atrelada a refrigeração (Watson, 2000).

Tabela 2. Vigor de espermatozoides de coelhos mantidos sobre refrigeração (7°C), utilizando diferentes doses de BHT e avaliados em diferentes tempos.

Tratamento/Tempo	0h	4h	8h	12h	24h	48h	72h
Controle	2,0 ±	1,5 ±	1,5 ±	1,0 ±	0,5 ±	0,0 ±	0,0 ±
(0,0 BHT)	0,7	0,5	0,5	0,0	0,5	0,0	0,0
T1	1,7 ±	1,2 ±	1,2 ±	1,0 ±	1,0 ±	0,7 ±	0,2 ±
(0,5 mmol BHT)	0,8	0,4	0,4	0,0	0,0	0,4	0,4
T2	1,5 ±	1,0 ±	1,0 ±	1,0 ±	1,0 ±	0,7 ±	0,5 ±
(1,0 mmol BHT)	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,5
T3	1,5 ±	1,0 ±	1,0 ±	1,0 ±	1,0 ±	0,7 ±	0,2 ±
(2,0 mmol BHT)	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,4

Viabilidade espermática representada em escala de 0 a 5. Comparações realizadas entre os tratamentos para cada tempo utilizando o teste de Kruskal-Wallis não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$).

No presente estudo percebe-se que embora a motilidade dos espermatozoides tenha se mantido no T1, o vigor que é atrelado a qualidade do movimento não teve resultados satisfatórios para nenhum dos tratamentos. Esses resultados sugerem que o BHT não possui ação sobre o vigor seminal nas condições utilizadas durante este estudo. Oliveira et al. (2023), observaram que o vigor do sêmen se manteve por até 48h utilizando o diluidor comercial Botusemen[®] utilizando uma temperatura de 5°C.

Estudos futuros para avaliar o efeito da adição do BHT a diluidores comerciais na conservação de sêmen mantido em temperaturas mais baixas são sugeridos a partir dos resultados observados no presente estudo.

6. CONCLUSÃO

A inclusão de 0,5 mmol de BHT por mL do diluidor BotuSemen® proporcionou melhor resultado para a motilidade espermática em sêmen mantido sobre refrigeração a 7°C. Referente ao vigor, não houve resultado superior para manutenção da atividade dos espermatozoides. Conclui-se que a adição de BHT ao meio diluidor afetou positivamente apenas o parâmetro de motilidade espermática nas condições do presente estudo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando os resultados satisfatórios obtidos no parâmetro de motilidade espermática e na preservação do sêmen por até 24 horas, novos estudos são recomendados na área, sendo sugeridas algumas estratégias para melhor avaliação de resultados futuros. Considera-se importante avaliar o efeito de diferentes temperaturas de armazenamento do sêmen e do ambiente de coleta, visto que altas temperaturas podem afetar a espermatogênese e o interesse dos machos para realizar a coleta de sêmen utilizando vaginas artificiais. Uma das dificuldades encontradas no presente estudo foi à realização do projeto no verão, o que tornou desafiadora a coleta da quantidade necessária de sêmen para montagem dos *pools* para as avaliações. O estudo de protocolos para melhoria na diluição dos antioxidantes também é importante, principalmente considerando a dificuldade de solubilização do BHT que foi observada no presente estudo. O aumento do número de dias de treinamento dos coelhos machos, bem como o aumento do plantel de machos para realizar estudos de qualidade seminal também é recomendado para facilitar a coleta e padronização do sêmen utilizado. Num cenário ideal, realizar a coleta e análise de parâmetros de qualidade do sêmen de forma individual traria mais resultados com possibilidade de cálculos da quantidade de espermatozoides móveis e viáveis para fecundação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, J. R.; LAMBOURNE S.; GIBB, Z. The John Hughes memorial lecture: aspects of sperm physiology - oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 1, p. 17-27, 2014.

ALAGO, C. A. R. **Influência do genótipo e da estação do ano nas características do sêmen de coelho**. Dissertação (Engenharia Zootécnica) - Évora: Universidade de Évora/Escola de Ciências e Tecnologia, 2013. 32 p.

ALENCAR, J. A. **Proteômica do plasma seminal e expressão gênica e localização da NGF e seus receptores (TRK1 e NGFR) no sistema genital de coelhos**. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, 2015. 315 p.

ALLAI, L.; BENMOULA, A.; SILVA, M. M.; NASSER, B. et al. Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. **Animal Reproduction Science**, v. 192, p. 6-17, 2018.

ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V.; SCAPINELLO, C.; MARTINS, E. N. et al. Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre as características quantitativas e qualitativas do sêmen de coelho. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 28, n. 2, p. 117-185, 2006.

ALVARINÕ, R. M. Productive performance of male rabbits. **The Journal of The World Rabbit Science Association**, v. 8, p. 13-35, 2000.

AMIDI, F.; PAZHOGHAN A.; NASHTAEI, M. S.; KHODARAHMIAN, M. et al. The role of antioxidants in sperm freezing: A review. **Cell Tissue Bank**. v.17, n. 4, p. 745-756, 2016.

ANDRADE, A. F. C.; CELEHINI, E. C. C.; YONEZAWA, L. A.; SPERS, A. et al. Eficiência in vitro de três diluidores para sêmen de coelho. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, p. 33-39, 2008.

ARAUJO, E. A. B. **Efeito da adição de Butil-hidroxitolueno nos meios de refrigeração e congelamento sobre a viabilidade espermática de equinos**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia Animal, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, p. 60. 2016. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/e27bc4cd-ecaa-4b20-be2d-3806bb115c64>. Acesso em: 25 mar. 2024.

ARREBOLA, D.F.A.; FERNÁNDEZ, L.A.R. Analysis of seminal quality, a tool in fertility experimental toxicology study. **Revista de Toxicología en Línea**, p. 39-50, 2011.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1-7, 2011.

BETANCUR, G.R.; LÓPEZ, E.P.; ROJANO, B.A. Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. **Revista Lasallista de Investigación**, v.9, p.128-136, 2012.

BRITO, L. F.C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 249-264, 2007.

BUSCAR RURAL. **Criação de coelhos**. 2022. Disponível em: <https://blog.buscarrural.com/agronegocio/coelhos-brasileiros-comecam-a-ter-interesse-na-criacao-dos-animais/>. Acesso em: 05 nov. 2023.

CAMPOS, A. C. N.; GURREIRO, M. E. F.; CADELHA, C. R. R.; CATUNDA, A. G. V. et al. Principais características do sêmen de coelho da raça Nova Zelândia branco criados em clima tropical. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 284-295, 2012.

CARLUCCIO, A.; ROBBE, D.; AMICIS, I.; CONTRI, A. et al. Technical Note: artificial insemination in rabbits. **World Rabbit Science**, v. 12, n. 2, p. 65-79, 2010.

CASTELLINI, C. Semen Production and management of rabbit bucks. In: **Anais... 9th World Rabbit Congress**. Verona, Italy, 10-13 junho, 2008. p. 265-277. 2008.

CASTELLINI, C.; MOURVAKI, E.; BOSCO, D. A.; GALLI, F. Vitamin e biochemistry and unction: a case study in male rabbit. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 3, p. 248-256, 2007.

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

CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube. **Nature**, v. 20, p. 697-698, 1959.

CHRENEK, P.; TRANDZIK, J.; MASSANVI, P.; MAKAREVICH. A. et al. Effect of transgenesis on reproductive traits of rabbit males. **Animal Reproduction Science**, v. 99, p. 127–134, 2007.

DOMINGO, P.; OLACIREGUI, M.; GONZALEZ, N.; BLAS, I. et al. Effect of glycerol, n, n-dimethylformamide and n-methyl-2-pyrrolidone on rabbit sperm stored at 4 °C and 16 °C. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 4, p. 887-894, 2019.

FARIA, H. G.; FERREIRA, W. M.; SCAPINELLO, C.; OLIVEIRA, C. E. A. Efeito da utilização de dietas simplificadas, à base de forragem, sobre a digestibilidade e o desempenho de coelhos Nova Zelândia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 10, p. 1797-1801, 2008.

FERREIRA, W.; MACHADO, L.; JARUCHE, Y.; CARVALHO, G. et al. **Manual prático de cunicultura**. Editor: Luiz Carlos Machado. Bambuí, Brasil, 2012.

GANDINI, L.; LOMBARDO, L.; PAOLI, D.; CAPONECCHIA, L. et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, n. 4, p. 830-839, 1 abr. 2000.

GLIOZZI, T. M.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; LUZI, F. et al. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 910-919, 2009.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 213 p. 2004.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000.

IJAZ, A.; HUSSAIN, A.; ALEEM, M.; YOUSAF, M. S. et al. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1326-1329, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Agropecuário de 2017**. Rio de Janeiro: IBGE, 2022. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=73101>. Acesso em 20/04/2024.

International Rabbit Reproduction Group - IRRG. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. **World Rabbit Science**, v. 13, p.71– 91, 2005.

LEWCHALERMVONG, K.; KULNANAN, P.; BOONCHAY, K.; THAIKOED, S. et al. Semen characterization of dang surat thai native chicken. **Veterinary Integrative Sciences**, v. 21, n. 1, p. 175-185, 2023.

KHUMRAN, A. M.; YIMER, N.; ROSNINA, Y.; ARIFF, M. O. et al. Butylated hydroxytoluene can reduce oxidative stress and improve quality of frozen–thawed bull semen processed in lecithin and egg yolk-based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 128-134, 2015.

LEBAS, F.; COUDERT, P.; ROCHAMBEAU, H.; THÉBAULT, R. G. **The rabbit - Husbandry, health and production**. ed. 21. Roma: FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1997. 274 p.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 6. Edição. Porto Alegre, 2014. 1298 p.

LÓPEZ, F. J.; ALVARIÑO, J. M. R. Artificial insemination of rabbits with diluted semen stored up to 96 hours. **World Rabbit Science**, v. 6, n. 2, p. 1695-1706, 2010.

LUCINI, G.; FUKUMOTO, N. M. Inseminação artificial na suinocultura. **Revista Ibero – Americana de Humanidades, Ciência e Educação – REASE**, v. 9, n. 09, p. 172-183, 2023.

MAES, D.; NAUWYNCK, H.; RIJSSELAERE, T.; MATEUSEN, B. et al. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1337-1345, 2008.

MANN, T. Studies on the metabolism of semen. **Biochemical Journal**, v. 39, n. 5, p. 458-465, 1945.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v. 14, n. 3, p. 251-272, 1977.

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; SEIDEL, G. E. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 1, p. 2-12, 2008.

MERINO, O.; SÁNCHEZ, R.; RISOPATRÓN, J.; ISACHENKO, E. et al. Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: first report. **Andrologia**, v. 44, p. 390-395, 2011.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? dna, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 287-301, 2010.

MOCÉ, E.; VICENTE, J. S. Rabbit sperm cryopreservation: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 110, n. 1, p. 1-24, jan. 2009.

MOURA; B. B. “**Produção de coelhos**” – Editora EMATER-RIO. Apoio: Secretaria RJ, BRASIL, 2007.

MOURVAKI, E.; CARDINALI, R.; BOSCO, A. D.; CORAZZI, L. et al. Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 629-637, 2010.

MOURVAKI, E.; CARDINALI, R.; BOSCO, A. D.; CORAZZI, L. et al. In vitro antioxidant activity of the prostatic secretory granules in rabbit semen after exposure to organic peroxides. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2010.

MUKHERJEE, D. P.; JOHARI, M. P.; BHATTACHARYA, P. The gelatinous mass in rabbit semen. **Nature**, v. 168, n. 4271, p. 422-423, 1951.

NABI, M. M.; KOHRAM, H.; ZHANDI, M.; YEGANEH, H. M. et al. Comparative evaluation of Nabi and Beltsville extenders for cryopreservation of rooster semen. **Cryobiology**, v. 72, n. 1, p. 47-52, 2016.

NEAGU, V. R.; GARCÍA, B. M.; SANDOVAL, C. S.; RODRÍGUEZ, A. M. et al. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 645-650, 2010.

NISHIJIMA, K.; KITAJUMA, S.; MATSUHISA, F.; NIIMI, M. et al. Strategies for highly efficient rabbit sperm cryopreservation. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1220, 2021.

NIZZA, A.; MEO, C.; TARANTO, S. Effect of collection rhythms and season on rabbit semen production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 6, p. 436-439, 2003.

ONUOHA, C. H. Reproductive physiology of male rabbits: a key factor in buck selection for breeding (paper review). **Advances in Reproductive Sciences**, v. 08, n. 02, p. 97-112, 2020.

OSHIO, S.; KANEKO, S.; MOHRI, H. Characterization of rabbit sperm by equilibrium sedimentation in percoll during frequent ejaculation. **Archives of Andrology**, v. 17, n. 3, p. 189-194, 1986.

- PARRISH, J.J.; FOOTE, R. H. Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 2, p. 253-257, 1986.
- PARSONS, U. Fructose in rabbit semen: a study of normal fluctuations, and changes evoked by testosterone and stilboestrol. **Journal of Endocrinology**, v. 6, n. 4, p. 412-422, 1950.
- PEGG, D. E. The history and principles of cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 1, p. 005-014, 2002.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, n. 7, p. 597-612, 2006.
- PURDY, P. H; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v. 48, n. 1, p. 36-45, 2004.
- QUESENBERY, K. E.; DONNELLY, T. M.; MANS, C. Biology, husbandry, and clinical techniques of guinea pigs and chinchillas. **Ferrets, Rabbits, and Rodents**, p. 279-294, 2012.
- ROCA, J.; MARTÍNEZ, S.; ORENGO, J.; PARRILLA, I. et al. Influence of constant long days on ejaculate parameters of rabbits reared under natural environment conditions of Mediterranean area. **Livestock Production Science**, v. 94, p. 169-177, 2005.
- Saragusty, J. & Arav, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction**, **141**: 1-19. 2011.
- SELEEM, T. S. T., ROWIDA, M. R. Enzymatic activity and fertilizing ability of rabbit semen supplemented with nigella sativa extraction. In: **Anais...** 4th International Conference on Rabbit Production in Hot Clim. Sharm El-Sheikh, Egypt, 3-6 set. p. 285-289. 2005.
- SHOAE, A.; ZAMIRI, M. J. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2-4, p. 414-418, 2008.

SILVA, H. V. R.; NUNES, T. G. P.; FILHO, A. C. M.; PINTO, J. N. et al. Adição de hidroxitolueno butilado (BHT) no diluidor ACP-106^c para congelação de sêmen canino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p. 45-89, 2018.

SUÁREZ, A. C.; SIERRA, A. P.; MONTOYA, P. J. D.; RESTREPO, G.B. Subpoblaciones espermáticas en el semen de conejo refrigerado con diferentes diluyentes. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 32, n. 5, p. 21, 27 out. 2021.

TOSHIMORI, K.; ITO, C. Formation and organization of the mammalian sperm head. **Archives of Histology and Cytology**, v. 66, n. 5, p. 383-396, 2003.

TRZCINSKA, M.; BRYLA, M.; GAJDA, B.; GOGOL, P. Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 307-313, 2015.

VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 16-24, 2014.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen**. 6. ed. 292p. Disponível em:

<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/343208/9789240030787-eng.pdf?sequence=1>.

Acesso em 07/05/2024.

ANEXO 1

Treinamento dos machos para coleta de sêmen.

Para a padronização das análises e coleta de sêmen foi realizado um treinamento utilizando 20 machos da raça nova Zelândia Branco provenientes do próprio coelhário da fazenda, com 8 meses de idade, pesando em média 4 kg. A coleta do material genético foi realizada com utilização de uma vagina artificial por um período de 30 dias, realizando uma coleta por semana.

Para a confecção da vagina artificial foi utilizada uma bucha de cano PVC de 50x20 mm e no seu interior foi utilizado um balão de látex (7 cm) preenchido com água aquecida à temperatura natural da vagina da fêmea (40-42°C). Como mucosa foi utilizado preservativo estéril de uso humano, que atuou como proteção do órgão genital do macho. Os componentes foram fixados com elástico nº 18, para evitar o vazamento de água aquecida. Para deposição do sêmen necessário para as análises, foi realizado um corte na parte inferior do preservativo e fixação de um tubo coletor transparente com elástico, conforme demonstrado na figura 1 abaixo.

Figura 1. Utensílios utilizados para confecção da vagina artificial (A) e estrutura montada (B)



Fonte: Camila Kuster Xavier, 2023.

Para o manequim foi utilizado um cano PVC (100 mm) e uma pele de coelho com cheiro da fêmea sobre (Figura 2). A coleta de sêmen foi realizada estimulando o macho a realizar a monta no manequim e ejacular na vagina artificial posicionada pelo pesquisador.

Figura 2. Manequim montado usado para coleta de sêmen



Fonte: Camila Kuster Xavier, 2023

No estudo foi avaliado aspecto e volume do sêmen de cada macho, motilidade espermática, vigor e concentração de espermatozoides.

Tabela 1 – Análise descritiva de motilidade, vigor e concentração individual de espermatozoides dos machos ao longo do treinamento.

Mach o	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Motilidade				
1	70%	70%	70%	85%
4	NC	50%	65%	80%
9	80%	50%	75%	70%
12	NC	NC	70%	70%
26	80%	55%	65%	70%
31	30%	80%	NC	NC
32	70%	65%	65%	65%
34	80%	60%	70%	80%
36	65%	55%	70%	70%

37	75%	65%	75%	65%
39	65%	60%	85%	60%
41	NC	60%	60%	50%
46	30%	30%	65%	60%
53	65%	70%	70%	60%

Vigor				
1	3	5	2	2
4	NC	1	1	3
9	3	1	2	1
12	NC	NC	3	2
26	4	1	1	1
31	2	3	NC	NC
32	4	2	1	2
34	4	1	2	3
36	3	2	3	2
37	3	2	3	2
39	2	1	1	1
41	NC	1	1	1
46	2	1	2	1
53	2	3	2	2

*NC: não coletado

Padronização das análises

Nos treinamentos foram avaliados a motilidade espermática do sêmen fresco, onde o objetivo era padronizar os animais com uma motilidade de no mínimo 65% para a utilização do diluente. Foram montados pools de sêmen com média de 3 machos por *pool*.

Foram realizados quatro pools com o sêmen durante a padronização. A qualidade seminal foi analisada em 0, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas, tendo como intuito a verificação de cada parâmetro com o decorrer das horas.

Análises laboratoriais

Foram realizadas as seguintes análises de qualidade seminal durante a padronização:

Motilidade (MOT): Representada pela quantidade de espermatozoides vivos em movimento.

Vigor: Determina a qualidade da velocidade de progressão dos espermatozoides em escala de 0 a 5 (ALENCAR, 2015).

Concentração espermática: É medida pela quantidade de espermatozoides contidos na amostra de cada ejaculado, em coelhos pode variar de 50 a 500 x 10⁶/ ml (ALVARIÑO, 2000), é avaliada através da câmara de Neubauer.

Aspecto: A alta concentração espermática do sêmen atribui uma aparência cremosa, enquanto um ejacula mais aquoso é atribuído a uma baixa qualidade seminal (CAMPOS *et al.*, 2012).

Volume: O volume de um ejaculado de coelhos pode variar de 0,3 a 0,6 ml, podendo sofrer variações de acordo com a raça, temperatura, alimentação e clima (Campos *et al.*, 2012).

Morfologia: É avaliada através do esfregaço em lâminas pigmentadas com corantes específicos. É realizada a contagem de cem espermatozoides, com posterior contagem de patologias.

Tabela 2 – Análise descritiva média da qualidade seminal dos machos por semana.

Avaliações	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Nº machos	10	14	14	14
Volume	2,15	2,04	2,8	1,91
Cor	NR	100% (A)	21% (C)	100% (A)
Gel	NR	67%	39%	7%
Motilidade (%)	68%	59%	68,9%	68%
Vigor	3 A	1,75 B	1, 86 B	1, 71 B
Concentração (mL)	2,95E+08	NR	2,88E+07	4,68E+08
Morfologia (%)	8,90	NR	11,5	8,9
Cabeça fusiforme (n)	5	NR	6	3
Globozoospermia (n)	10	NR	3	NE
Macrocefálico (n)	2,4	NR	1	NE

* médias dos coelhos coletados na semana. NR - não realizada; NE - não encontrado; A – aquoso; C - clara.