

## Avaliação da toxicidade de solvente de extratos vegetais com ação antiviral em sêmen caprino refrigerado\*

Evaluation of Solvent Toxicity of Plant Extract with Antiviral Action in Refrigerated Goat Semen

Renato Mesquita Peixoto<sup>1</sup>, Alice Andrioli<sup>2</sup>, Diones Oliveira Santos<sup>2</sup>, Raymundo Rizaldo Pinheiro<sup>2</sup>, Juscilânia Furtado Araújo<sup>1</sup>, Ana Lídia Madeira de Sousa<sup>1</sup>, Davi Faria Silva<sup>4</sup>, Edgar Marques Damasceno<sup>3</sup> & Maria Fátima da Silva Teixeira<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Background:** Caprine Arthritis Encephalitis Virus have been detected in sperm of breeding goats causing economic losses. In order to control the virus, researches aiming to identify natural extracts with potential antiviral effects are performed. However, aqueous or ethanolic extracts must be diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO), which is a substance with unknown effects in sperm quality when present in diluting media. Therefore, this study aimed to evaluate sperm viability of refrigerated caprine semen diluted in media containing DMSO. This was performed to provide data that aid in researches involving the use of this component with natural extracts that may inactivate the caprine lentivirus in sperm.

**Materials, Methods & Results:** The experiment was performed at the Laboratory of Seminal Technology in Embrapa Goats and Sheep in the city of Sobral, Brazil. Sperm viability was assessed in caprine semen refrigerated in two dilution media with crescent concentrations of DMSO. Sperm samples of five goats seronegative for the caprine lentivirus were pooled and diluted in minimal essential medium (MEM) enriched with glucose at 0.01 M added of crescent concentrations of DMSO (0%, 1.5%, 1.75%, 2.0%, 2.25% and 2.5%). The same breeders provided the pool of sperm to test Tris added 2.5% of egg yolk and the same concentrations of DMSO previously mentioned. Treatments were refrigerated at 7°C and evaluated up until four h after DMSO addition. Individual progressive motility (MIP), sperm vigor (V), percentage of spermatozoa reactive to hypoosmotic test (HO) and morphologically normal (NOR) were evaluated. IPM, vigor and NOR remained within normal standards for the caprine species in all treatments test. Percentage results of spermatozoa reactive to hypoosmotic was higher in Tris yolk with values ranging between 34.66% to 46.33%. Sperm vigor was positively correlated ( $r = 0.85$ ) with IPM in the MEM diluted pool of sperm. In Tris yolk, vigor and hypoosmotic test correlated moderately ( $r = 0.63$ ,  $r = 0.54$ , respectively) with IPM. Tris yolk medium added DMSO presented the highest percentage of reactivity to hypoosmotic test in all treatments when compared to MEM added DMSO.

**Discussion:** The fact that DMSO is easily homogenized in water, ethylic alcohol and most organic solvents favors its use in diluting natural extracts. These components are a possible source of products that inactivate caprine arthritis encephalitis virus in sperm, which is the key to promoting the safe use of genetic material of infected breeders, in addition to commercial use of germplasm. In this study, there was no interference of DMSO in the analyzed parameters when added in a maximum concentration of 2.5% to MEM and Tris yolk, which is in accordance with standard values for goats. In addition, Tris yolk may promote greater protection to the membrane of sperm cells, which was demonstrated by hypoosmotic test. This medium could be ideal to be used in new methodologies that incorporate DMSO. In conclusion, DMSO added to dilution media Tris yolk and MEM did not interfere with the quality of refrigerated caprine sperm, which maintained viability. These results indicate that this substance did not present harmful effects to the genetic material, promoting the use as solvent of extracts from plant compounds with potential anti-viral effect. The information in this study may aid new research performed in this area.

**Keywords:** Dimethyl sulfoxide, MEM, Tris yolk, sperm preservation.

**Descritores:** dimetilsulfóxido, MEM, Tris Gema, preservação do sêmen.

Received: 3 May 2017

Accepted: 4 September 2017

Published: 18 September 2017

\*Article based on a Dissertation submitted by the senior author in partial fulfillment of requirements for the Doctor's Degree at the Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. <sup>1</sup>Laboratório de Virologia (LABOVIR), PPGCV, UECE, Fortaleza. <sup>2</sup>EMBRAPA Caprinos e Ovinos (CNPACO), Sobral, CE. <sup>3</sup>Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), Sobral. <sup>4</sup>Instituto Superior de Teologia Aplicada (Faculdades INTA), Sobral. CORRESPONDENCE: R.M. Peixoto [renatomiraima@gmail.com - Fax: +55 (85) 3101-9849]. LABOVIR, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Dr. Silas Munguba n. 1700. Campus do Itaperi. CEP 60740-000 Fortaleza, CE, Brazil.

## INTRODUÇÃO

A possibilidade de contaminação direta do sêmen por microorganismos, como o vírus da artrite encefalite caprina (CAEV), presente no sêmen de caprinos na forma de DNA pró-viral [25] como também de RNA viral [17] inviabiliza o uso do reprodutor, e a comercialização de seu germoplasma.

Assim, muitas pesquisas tem se direcionado para extratos de fitocompostos de produtos naturais com potencial efeito antiviral para retirar ou inativar o CAEV do sêmen, porém estes devem ser previamente dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) independente de serem aquosos ou etanólicos [3,6]. A escolha dessa substância como meio para dissolução dessas drogas ocorre pela sua fácil solubilidade em ambientes aquosos e etanólicos, e versatilidade associada com inúmeras propriedades farmacológicas [1]. Além disso, o DMSO possui capacidade de interagir com drogas naturais sem causar alteração na estrutura molecular, propiciando assim que inúmeras substâncias quando associadas a ele sejam carregadas com efeitos potencializados através das membranas, enquanto que a nível celular exerce efeito sinérgico com tais substâncias [10].

Portanto, ao testar drogas cuja incorporação ocorreria no diluidor seminal deveria ser levado em consideração o efeito destas, e no caso do DMSO, a sua ação individual na qualidade espermática durante o processo de resfriamento, e influência nos parâmetros seminais. Nessa concepção, por ser algo desconhecido no enfoque utilizado, objetivou-se avaliar a viabilidade espermática de sêmen caprino refrigerado diluído em diferentes meios acrescidos de concentrações crescentes de DMSO para poder utilizá-lo em eventuais pesquisas com extratos naturais que possam inativar o CAEV no sêmen.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Localização

O experimento foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Sêmen da Embrapa Caprinos e Ovinos na cidade de Sobral - CE, nordeste do Brasil, à latitude de 3° 42' sul, longitude de 40° 21'.

### Animais

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Anglo-nubiano com idade de 12 a 24 meses, soronegativos para o lentivírus caprino obtidos após três testes consecutivos de Western Blot (WB) e de PCR Nested (PCRn) no sangue, com intervalo de 30 dias.

### Procedimento Experimental

Todos os animais foram submetidos a quatro coletas de sêmen, com intervalo de sete dias, por meio de vagina artificial modelo curto na presença de uma fêmea ovariectomizada com estro induzido pela aplicação de 1 mL de benzoato de estradiol<sup>1</sup>, 48 h antes da coleta, e imobilizada em tronco de contenção de forma a facilitar a monta e a coleta.

À medida que o sêmen era coletado o mesmo era de imediato destinado ao Laboratório de Tecnologia de Sêmen para realização do espermograma, quantificando os seguintes parâmetros: volume (mL), concentração espermática ( $\times 10^9$  espermatozoide/mL), motilidade individual progressiva (MIP, 0-100%), e vigor (0-5), de acordo com os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) [9]. Após cada coleta colocou-se o sêmen em banho-maria a 37°C e determinou-se o volume do ejaculado por meio da graduação do tubo coletor de polipropileno<sup>2</sup>. Em seguida, uma gota de sêmen foi colocada juntamente com uma gota de solução salina entre lâmina<sup>3</sup> e lamínula<sup>4</sup> pré-aquecida a 37°C e observada em microscópio óptico (Laborlux 12 ME)<sup>5</sup> com aumentos de 10 e 40x, verificando a motilidade progressiva retilínea (percentual) e o vigor espermático. Posteriormente, acrescentou-se 50  $\mu$ L do sêmen em 10 mL de solução fisiológica formolizada a 0,1% tamponada para contagem das células espermáticas, utilizando-se espectofotômetro (Spectronic 20)<sup>6</sup>, para determinação da concentração espermática por mL e no ejaculado total.

Realizada a avaliação *in vitro* de cada ejaculado, o sêmen dos reprodutores com MIP  $\geq 80\%$  e vigor  $\geq 3$  foram misturados formando um *pool* e em seguida diluídos em: meio essencial mínimo<sup>7</sup> contendo glicose<sup>8</sup> a 0,01 M e no diluidor Tris<sup>8</sup> (Tris-hidroximetil-aminometano- $H_2NC(CH_2OH)_3$ ) com adição de frutose<sup>8</sup> a 0,5%, ácido cítrico<sup>9</sup> a 1,99% e gema de ovo à 2,5%. A diluição do *pool* de sêmen foi feita para obter a concentração de  $2 \times 10^9$  espermatozoides processáveis/mL em ambos os diluentes.

O *pool* de sêmen foi em seguida resfriado em geladeira (7°C), por 2 h para estabilizar a temperatura do material. Após isso, o *pool* de sêmen foi dividido em tubos de 15 mL, acrescido de dimetilsulfóxido (DMSO)<sup>8</sup> para a obtenção das seguintes concentrações: 0, 1,5; 1,75; 2,0; 2,25 e 2,5%. Adicionalmente, foram avaliados os parâmetros de motilidade individual pro-

gressiva e vigor espermático do *pool* de sêmen, nas diferentes concentrações de DMSO, com intervalo de 2 h, até um período máximo de 4 h pós adição do diluente.

Concomitantemente eram feitas lâminas para observação da morfologia espermática por meio de esfregaços corados com azul de bromofenol<sup>8</sup>, e avaliação de 200 células em microscópio óptico (Leica DM 500)<sup>10</sup> [100x]. Foi realizado teste hiposmótico, onde 50 µL de cada amostra era depositada em tubo de 2,5 mL contendo 500 µL de solução hiposmótica com osmolaridade de 179 mOsmol/L composta de citrato de sódio<sup>8</sup> e água milli-Q. Após 20 min, 30 µL dessa mistura era colocado em lâmina e lamínula contendo 60 µL de glutaraldeído<sup>11</sup> e efetuado a contagem dos espermatozoides com membrana plasmática íntegra através da observação em microscópio óptico<sup>10</sup> com contraste de fase de aumentos de 40x, realizando a contagem de 100 células.

#### Análise Estatística

A consistência dos dados e análise descritiva (médias e desvio padrão) das características avaliadas nas diferentes concentrações de DMSO, em ambos os diluidores, foram comparadas pelo Teste de *t* de Student a 5% de significância, e submetido à correlação de Pearson.

### RESULTADOS

Independente do tipo de diluente utilizado, os valores encontrados de motilidade individual progressiva (MIP) e vigor espermático (V) apresentaram-se em conformidade com os preconizados pelo CBRA [9]. Em adição, pode ser observado que não houve interferência do DMSO nos parâmetros de MIP e V (Tabela 1), quando esse foi adicionado a uma concentração máxima de 2,5% ao MEM. Ao efetuar a análise estatística desses dois parâmetros entre os diluidores, o vigor do sêmen que foi diluído em MEM sem acréscimo de DMSO apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) com relação ao *pool* diluído em Tris Gema, também sem DMSO (Tabela 1). Quanto ao sêmen diluído em Tris Gema foi encontrada diferença estatística ( $P < 0,05$ ) para a MIP, em diferentes concentrações de DMSO.

No que diz respeito ao percentual máximo de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HO), percebe-se que o meio Tris gema acrescido de DMSO apresentou maior percentual de reatividade em todos os tratamentos quando comparado com o MEM incrementado com DMSO. Na avaliação separada por

diluente, notou-se que os percentuais detectados de espermatozoides com membrana funcional intacta, em sêmen diluído em MEM, não apresentaram diferença estatística ( $P > 0,05$ ) nas diversas concentrações de DMSO. Observou-se diferença estatística quanto ao HO do sêmen diluído em Tris Gema sem DMSO em relação ao sêmen diluído no mesmo meio, mas com concentrações de 1,5 à 2,25% de DMSO, porém não foi observado quando a concentração foi de 2,5%. Em adição, o maior percentual de reatividade ao teste hiposmótico ( $23,83 \pm 7,75$ ), do sêmen diluído em MEM foi com 2,5% de DMSO, assim foi sugestivo que o DMSO não afeta a membrana espermática.

Quanto ao percentual de espermatozoides morfológicamente normais (Tabela 1) observou-se que os valores permaneceram dentro dos padrões entre 80 a 90% recomendados para caprinos [9], em todos os tratamentos, havendo diferença estatística ( $P < 0,05$ ) apenas na concentração de 2,0% de DMSO entre os diluentes seminais, com o Tris Gema vindo a apresentar um maior percentual ( $94,41 \pm 4,53$ ) de células espermáticas normais, em relação ao MEM ( $88,91 \pm 3,51$ ) nesse tratamento.

Evidenciou-se que dentre as alterações encontradas na morfologia espermática em todos os tratamentos, independente do diluidor, o principal defeito foi relacionado a problemas de cabeça (Tabela 2). Nos tratamentos onde o diluidor utilizado foi o meio essencial mínimo (MEM) denota-se que até uma concentração de 1,75% de DMSO o defeito morfológico que teve maior incidência após os de cabeça foram defeitos de peça intermediária (DPI), porém essa situação se modificou à medida que ocorria aumento da concentração de DMSO a esse tipo de diluidor, onde nesse caso os defeitos de flagelo passaram a ter maior ocorrência que os de peça intermediária.

Já no diluidor Tris Gema foi observado que em todas as concentrações de DMSO, o segundo maior percentual de defeito morfológico era relacionado a defeitos de flagelo, indicando que concentrações maiores de DMSO a esse diluidor determinaria maiores incidências desse tipo de alteração espermática, a qual é prejudicial à fertilidade da célula. Exatamente nesse diluente, denotou-se que durante as avaliações de patologia espermática encontrou-se um defeito raro que é a presença de um espermatozoide bicaudal (Figura 1) na concentração de 2,25% de DMSO acrescido ao diluente Tris Gema.

**Tabela 1.** Características espermáticas do *pool* de sêmen de cinco reprodutores caprinos, refrigerado e diluído em meio essencial mínimo (MEM) ou Tris Gema a 2,5%, acrescidos de concentrações crescentes de dimetilsulfóxido (DMSO).

DMSO (%)	MEM				Tris Gema			
	MIP (%)	V (0-5)	HO (%)	NOR (%)	MIP (%)	V (0-5)	HO (%)	NOR (%)
0	75,00 ± 10,48Aa	3,83 ± 0,40Aa	20,83 ± 5,63Aa	87,10 ± 1,30Aa	81,66 ± 4,08Aa	3,16 ± 0,40Ba	46,33 ± 6,88Ba	90,00 ± 6,53Aa
	65,00 ± 16,43Aa	3,50 ± 0,54Aa	18,5 ± 11,91Aa	90,65 ± 1,90Aa	66,66 ± 8,16Ab	3,33 ± 0,51Aa	38,50 ± 4,50Bb	86,08 ± 19,49Aa
1,5	73,33 ± 10,32Aa	3,60 ± 0,51Aa	15,50 ± 7,60Aa	87,67 ± 11,80Aa	75,00 ± 10,48Aa	3,33 ± 0,51Aa	35,50 ± 8,75Bb	95,33 ± 2,08Aa
	70,00 ± 8,94Aa	3,60 ± 0,51Aa	19,83 ± 8,42Aa	88,91 ± 3,51Aa	70,00 ± 8,94Ab	3,16 ± 0,40Aa	34,66 ± 11,92Bb	94,41 ± 4,53Ba
2,0	78,33 ± 7,52Aa	3,83 ± 0,40Aa	21,50 ± 6,59Aa	88,75 ± 6,54Aa	73,33 ± 13,66Aa	3,16 ± 0,75Aa	34,66 ± 11,34Bb	94,16 ± 2,58Aa
	68,33 ± 14,71Aa	3,33 ± 0,81Aa	23,83 ± 7,75Aa	91,04 ± 1,83Aa	68,33 ± 14,71Ab	3,00 ± 0,89Aa	40,50 ± 6,02Ba	94,66 ± 2,85Aa

MIP= motilidade individual progressiva; V= vigor espermático; HO= formas reativas ao teste hiposmótico; NOR= espermatozoides morfológicamente normais. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os diluidores ( $P < 0,05$ ) para cada parâmetro; letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) dentro de cada meio diluidor.

Analisando as correlações das características espermáticas avaliadas no *pool* de sêmen diluído em MEM (Tabela 3) verifica-se que apenas o vigor (V) apresentou diferença estatística ( $P < 0,05$ ) e correlação positiva alta ( $r = 0,85$ ) com a motilidade individual progressiva (MIP). Observa que com o *pool* de sêmen diluído em Tris Gema, o vigor, juntamente com o percentual de formas reativas ao teste hiposmótico (HO) apresentaram correlação favorável e moderada ( $r = 0,63$ ;  $r = 54$ , respectivamente) com a MIP (Tabela 4).

#### DISCUSSÃO

A eficácia do dimetilsulfóxido (DMSO) como crioprotetor interno e/ou anti-inflamatório já está bem elucidada [12], agora o presente estudo constatou a viabilidade do sêmen quando essa substância for incluída ao diluente seminal para o processo de refrigeração, apresentando parâmetros seminais normais para espécie e similares a outros autores [25,27] que também avaliaram sêmen caprino refrigerado, porém sem DMSO. Desse modo, observa-se que o DMSO, independente da concentração testada nos diluentes MEM e Tris Gema não ocasionou efeito danoso sobre os espermatozoides.

Quanto ao percentual máximo de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HO), independente do diluente (MEM ou Tris gema) os dados obtidos

foram inferiores aos relatados em outras pesquisas [5,16,19]. Mas deve-se ressaltar, que nesses trabalhos a solução hiposmótica era composta de citrato de sódio com frutose apresentando osmolaridades de 150 mOsm/L e 412 mOsm/Kg, valores esses diferentes da osmolaridade da solução de citrato de sódio (179 mOsmol/L), não enriquecida com frutose, deste trabalho.

Altos índices de temperatura ambiente e umidade relativa do ar podem ter contribuído para a ocorrência desses baixos valores de reatividade ao teste, através de possíveis alterações da qualidade seminal por meio de modificações no processo de maturação no epidídimo que resultaria em problemas na membrana espermática dos espermatozoides [11,21], e com isso comprometendo a resposta dos mesmos ao teste hiposmótico.

Em adição, tratamentos em que o diluente é o Tris Gema há uma maior taxa de preservação da membrana da célula espermática a qual permanece com sua membrana normal do ponto de vista funcional, mesmo na presença de DMSO no diluente. Situação semelhante foi também relatada por outros autores [13,26] os quais mencionam que diluidores a base de gema de ovo determinam uma maior preservação da membrana plasmática, pois tem em sua composição frações lipoproteicas de baixa densidade que ajudam a preservar a

integridade da membrana celular do espermatozoide, determinando taxas maiores de reatividade ao teste hiposmótico. Fato esse não proporcionado pelo MEM, justificando assim a ocorrência de diferença estatística ( $P < 0,05$ ) entre esses dois diluidores em todos os tratamentos. Na literatura, diversos trabalhos relataram a qualidade e eficiência do Tris Gema como diluente seminal [15,25,27,28], pois o mesmo além de atuar como uma substância tampão acarreta uma desaceleração do metabolismo da frutose pelo espermatozoide, de modo a contribuir para preservação energética da célula espermática [7]. Partindo dessa premissa, presume-se que possivelmente esse diluente seja o ideal a ser adotado em metodologias que busquem a inativação do CAEV no sêmen através de extratos naturais dissolvidos em DMSO, tornando uma ferramenta auxiliar no combate a artrite encefalite caprina.

Mas vale ressaltar que os resultados apresentados nesse estudo corroboram com os de outros autores [24] no que diz respeito ao uso do MEM como diluente

seminal apresentando potencial de manutenção do sêmen caprino dentro dos padrões normais para a espécie, podendo vir a ser adotado como diluidor seminal.

Na análise das alterações encontradas na morfologia espermática houve uma grande detecção de problemas de cabeça (Tabela 2). Normalmente a ocorrência dessas alterações é atribuída a elementos tóxicos, advindos do próprio metabolismo espermático, como por exemplo, constituintes de espermatozoides imóveis ou anormais que apresentam capacidade de reação com o oxigênio e causam a degeneração, não podendo nesse caso, associar a incidência dessas alterações ao DMSO, uma vez que os índices de células espermáticas com morfologia normal permaneceram em conformidade para a espécie.

Nesse estudo também foi evidenciado a presença de um defeito raro, que é a presença de um espermatozoide bicaudal (Figura 1), pois, em geral, os principais defeitos morfológicos de sêmen caprino descritos na literatura são relacionados a problemas de

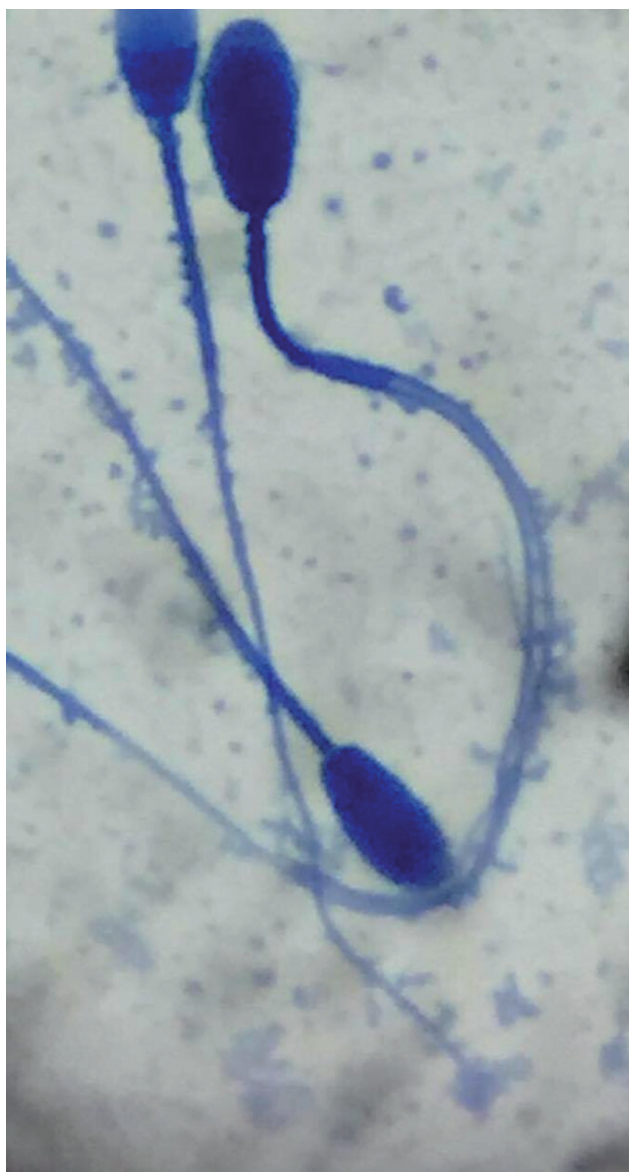
**Tabela 2.** Distribuição percentual de alterações na morfologia espermática de sêmen caprino refrigerado diluído em meio essencial mínimo (MEM) e Tris Gema a 2,5% acrescido concentrações crescentes de dimetilsulfóxido (DMSO).

DMSO (%)	Diluyente	Morfologia espermática (%)				
		NO	DA	DC	DPI	DF
0	MEM	87,10 ± 1,30	0,20 ± 0,00	7,60 ± 1,70	2,80 ± 0,00	1,90 ± 0,50
	TRIS	90,00 ± 6,53	0,00 ± 0,00	6,90 ± 5,80	1,20 ± 0,10	1,90 ± 0,60
1,5	MEM	90,65 ± 1,90	0,40 ± 0,60	3,39 ± 0,20	3,25 ± 2,20	2,34 ± 0,80
	TRIS	86,08 ± 19,49	0,09 ± 0,10	10,67 ± 11,30	1,25 ± 0,40	1,75 ± 0,50
1,75	MEM	87,67 ± 11,80	0,00 ± 0,00	9,31 ± 11,30	1,84 ± 0,50	1,19 ± 0,30
	TRIS	95,33 ± 2,08	0,00 ± 0,00	2,42 ± 0,10	0,92 ± 0,10	1,34 ± 0,40
2,0	MEM	88,91 ± 3,51	0,09 ± 0,10	5,75 ± 6,50	2,09 ± 1,30	3,17 ± 1,10
	TRIS	94,41 ± 4,53	0,00 ± 0,00	2,83 ± 1,60	0,59 ± 0,60	2,17 ± 0,60
2,25	MEM	88,75 ± 6,54	0,00 ± 0,00	6,00 ± 4,60	2,00 ± 0,50	3,42 ± 0,70
	TRIS	94,16 ± 2,58	0,00 ± 0,00	2,83 ± 0,20	0,67 ± 0,00	2,33 ± 0,50
2,5	MEM	91,04 ± 1,83	0,0 ± 0,00	4,58 ± 1,52	1,71 ± 0,76	2,52 ± 0,90
	TRIS	94,66 ± 2,85	0,0 ± 0,00	3,16 ± 0,94	0,75 ± 0,82	1,50 ± 0,29

NO= normais; DA= defeito de acrossomo; DC= defeito de cabeça; DPI= defeito de peça intermediária; DF= defeito de flagelo.

peça intermediária [2] e/ou de cabeça de espermatozoides [14], sendo esse último defeito o que mais foi observado nesse atual estudo.

Deve-se salientar que o efeito deletério, ocasionado por altas temperaturas, as quais são peculiares do nordeste brasileiro, prejudicam a qualidade seminal, resultando muitas vezes em aumento na temperatura testicular do animal e por consequência acarretando em degenerações específicas, ao ponto de propiciar irregularidades na morfologia espermática em etapas importantes do processo de espermatogênese [11] o que possivelmente contribuiu para determinar esse maior percentual de defeitos de cabeça relatado nesse trabalho.



**Figura 1.** Espermatozoide bicaudal na concentração de 2,25 de DMSO acrescido ao diluente Tris Gema.

Inúmeros fatores (protocolo, diluente, coloração) podem influenciar na análise patológica, inclusive a variação de cada reprodutor (o qual foi eliminado com a avaliação do *pool* e não de cada ejaculado), com isso há uma enorme relevância na avaliação da patologia espermática, pois conforme a distribuição de espermatozoides normais poderia determinar a fertilidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, dependendo da constituição da célula espermática [2]. Com isso, partidas de sêmen que venham a apresentar problemas de cauda dupla implicaria baixa qualidade espermática.

A motilidade espermática está diretamente relacionado com o poder dos espermatozoides de alcançarem o ambiente uterino e o local de fertilização [22], sendo de enorme importância que haja a ocorrência de correlação entre motilidade e vigor espermático, algo que foi evidenciado nesse estudo tanto nos tratamentos onde o DMSO foi incluso em MEM (Tabela 3) quanto nos que tinha o Tris gema como diluidor seminal (Tabela 4), corroborando assim com outros dados presentes na literatura que relatam correlação de moderada a alta entre MIP e V em sêmen caprino [4,18], correlação essa já relatada também em outras espécies de interesse zootécnico, como por exemplo, frangos [8] e bovinos [20].

Assim, vale salientar, que na busca constante por novas alternativas que venham a ser eficazes na retirada ou inativação do vírus da CAE no sêmen, observa-se que o DMSO é passível de ser incluso no diluente seminal, uma vez que os dados desse estudo demonstram que a viabilidade seminal permanece estável. Portanto, extratos naturais aquosos e/ou etanólicos com potencial antiviral, que normalmente possuam o DMSO como seu principal diluente, em virtude de sua capacidade de se misturar a água,

**Tabela 3.** Coeficientes de correlação de Pearson das características seminais de sêmen caprino refrigerado e diluído em meio essencial mínimo (MEM) enriquecido com glicose a 0,01 M.

	MIP	V	HO	NOR
MIP	-			
VIGOR	0,85*	-		
HO	0,30ns	0,19ns	-	
NOR	0,042ns	-0,036ns	0,218ns	-

MIP= motilidade individual progressiva; V= vigor espermático; HO= formas reativas ao teste hiposmótico; NOR = espermatozoides morfologicamente normais. \* = ( $P < 0,05$ ); ns= não significativo ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 4.** Coeficientes de correlação de Pearson das características seminais de sêmen caprino refrigerado e diluído em Tris Gema a 2,5%.

	MIP	V	HO	NOR
MIP	-			
VIGOR	0,63*	-		
HO	0,54*	0,29 ns	-	
NOR	0,085ns	-0,304ns	-0,232ns	-

MIP= motilidade individual progressiva; V= vigor espermático; HO= formas reativas ao teste hiposmótico; NOR= espermatozoides morfologicamente normais. \* = ( $P < 0,05$ ); ns= não significativo ( $P > 0,05$ ).

álcool etílico e grande parte de solventes orgânicos [10] torna-se uma ferramenta a ser validada em novos estudos que visem à inativação do vírus da CAE presente no sêmen de reprodutores.

### CONCLUSÃO

O DMSO adicionado aos diluentes seminais, MEM e Tris gema, não interferiu na qualidade do sêmen caprino refrigerado, o qual manteve sua viabilidade, indicando que essa substância não apresentou efeitos danosos a esse material genético, possibilitando o seu uso como solvente de extratos de fitocompostos

com potencial efeito antiviral. Adicionalmente, espera-se que as informações do presente estudo sirvam de subsídio para novas pesquisas dentro dessa vertente.

### MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Biofarm Química e Farmacêutica Ltda. Jaboticabal, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Techno Plastic Products AG. Trasadingen, Switzerland.

<sup>3</sup>Perfecta Indústrias e Comércio de Lâminas de Vidro Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Glasstécnica Importação e Comércio de Vidros Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

<sup>5</sup>Esselte Leitz GmbH & Co KG. Stuttgart, Germany.

<sup>6</sup>Bausch & Lomb. Rochester, NY, USA.

<sup>7</sup>GibcoLaboratories. Gaithersburg, MD, USA.

<sup>8</sup>Sigma-Aldrich Corporation. St. Louis, MO, USA.

<sup>9</sup>Dinâmica Repres e Serviços Ltda. Balneário Camboriú, SC, Brazil.

<sup>10</sup>Leica Camera AG. Wetzlar, Germany.

<sup>11</sup>Rioquímica S/A. São José do Rio Preto, SP, Brazil.

**Funding.** The work was financially supported by Funcap [Project number BP2-0107-00240.01.00/15] and EMBRAPA [Project number 02.13.10.003.00.05].

**Ethical approval.** This work is part of the PhD thesis of the first author. The research project was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA) under number 013/2014.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

### REFERENCES

- 1 Alves G.E.C. 1998. Dimetilsulfóxido (DMSO). *Saude Equina*. 1(6): 6-10.
- 2 Aragão C.P.M., Maia S.P., Cavalcante J.M.M., Campello C.C., Salgueiro C.C.M. & Nunes J.F. 2013. Efeitos da criopreservação sobre a morfologia e morfometria de espermatozoides de caprinos diluídos em meio a base da água de coco em pó (ACP-101c). *Ciência Animal*. 23(2): 16-28.
- 3 Ayres M.C.C., Brandão M.S., Vieira-Junior G.M., Menor J.C.A.S., Silva H.B., Soares M.J.S. & Chaves M.H. 2008. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 18(1):90-97.
- 4 Bezerra F.Q.G. 2011. Avaliação de parâmetros fisiológicos e andrológicos de caprinos jovens da raça Boer. *Revista de Medicina Veterinária*. 1(1): 99-100.
- 5 Bispo C.A.S., Pugliesi G., Palhão M.P., Coelho P.G.B., Ker P.G., Rodrigues M.T. & Carvalho G.R. 2011. Características *in vitro* e fertilidade do sêmen caprino armazenado a 5°C e por 24 horas utilizando duas concentrações de gema de ovo no diluente. *Ciência Animal Brasileira*. 12: 653-660.
- 6 Bona E.A.M., Pinto F.G.S., Fruet T.K., Jorge T.C.M. & Moura A.C. 2014. Comparação de métodos para avaliação da atividade microbiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivo do Instituto Biológico*. 81(3): 218-225.
- 7 Castelo T.S., Frota T.R. & Silva A.R. 2008. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinária Brasileira*. 2: 67-75.
- 8 Celeghini E.C.C., Albuquerque R., Arruda R.P. & Lima C.G. 2000. Correlações entre as características seminais, parâmetros testiculares (peso e histologia) e peso corporal em galos. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*. 1: 56.
- 9 Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA. 91p.
- 10 Ferrari M.V., Weiss R.R., Folador A., Ribeiro F.L. & Collodel S.T.S. 1999. Características seminais de ovinos (*Ovis aries*) submetidos a tratamentos com dimetilsulfóxido (DMSO). *Archives of Veterinary Science*. 4(1): 117-120.

- 11 Huang S.Y., Kuo Y.H., Lee Y.P., Tsou H.L., Lin E.C. & Lee W.C. 2000. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Animal Reproduction Science*. 23: 231-240.
- 12 Manjunath P. & Shivaprakash B.V. 2013. Pharmacology and clinical use of dimethyl sulfoxide (DMSO): A Review. *International Journal of Molecular Veterinary Research*. 3: 23-33.
- 13 Melo M.I.V., Henry M. & Beker A.R.C.L. 2005. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 57: 757-763.
- 14 Oliveira R.V., Nunes J.F., Salgueiro C.C.M., Cavalcante J.M.M., Moura A.A.A. & Araújo A.A. 2009. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou Tris, corados com eosina-negrosina e azul de bromofenol. *Ciência Animal Brasileira*. 10(3): 862-869.
- 15 Oliveira R.V., Nunes J.F., Salgueiro C.C.M., Cavalcante J.M.M., Brasil O.O. & Moura A.A.A.N. 2011. Avaliação de espermatozoides caprinos congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101®) ou Tris. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 6: 1295-1302.
- 16 Oliveira I.R.S., Alves H.M., Castelo T.S., Bezerra F.S.B., Bezerra A.C.D.S. & Silva A.R. 2013. Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. *Ciência Animal Brasileira*. 14: 216-221.
- 17 Peterson K., Brinkhof J., Houwers D.J., Colenbrander B. & Gadella B.M. 2008. Presence of pro-lentiviral DNA in male sexual organs and ejaculates of small ruminants. *Theriogenology*. 69: 433-442.
- 18 Santos A.D.F., Torres C.A.A., Fonseca J.F., Borges A.M., Guimarães J.D., Costa E.P. & Rovay H. 2006. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 35(5): 1934-1942.
- 19 Silva A.K.B. 2010. Utilização do teste hiposmótico na avaliação do sêmen refrigerado de pequenos ruminantes. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande.
- 20 Silveira T.S., Siqueira J.B., Guimarães S.E.F., Paula T.A.R., Miranda Neto T. & Guimarães J.D. 2010. Maturação sexual e parâmetros reprodutivos em touros da raça Nelore criados em sistema extensivo. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39(3): 503-511.
- 21 Silva M.R. & Souza B.B. 2016. Estresse térmico e sua influência na fisiologia hormonal de pequenos ruminantes. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*. 4(2): 50-54.
- 22 Siqueira J.B., Guimarães J.D., Costa E.P., Henry M., Torres C.A.A., Silva M.V.G.B. & Silveira T.S. 2007. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 36(2): 387-395.
- 23 Siqueira A.P., Silva Filho J.M., Fonseca J.F., Bruschi J.H., Palhares M.S., Borges A.M., Bruschi M.C.M., Peixoto M.P. & Rossi R. 2009. Taxa de concepção de cabras inseminadas com sêmen caprino resfriado a 5°C, por 12 ou 24 horas, em meio diluidor à base de gema de ovo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61: 66-71.
- 24 Souza K.C., Pinheiro R.R., Santos D.O. & Andrioli A. 2011. Viabilidade do meio essencial mínimo como diluidor de sêmen caprino em infecção experimental com vírus da artrite encefalite caprina (CAEV). In: *Resumos da XII Reunión Latinoamericana de Reproducción Animal* (Montevideo, Uruguai). Poster Salud Animal N12. CD-ROM. p.17.
- 25 Souza K.C., Andrioli A. & Teixeira M.F.S. 2014. Vírus da artrite encefalite caprina em sêmen: diagnóstico e transmissão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 38(2): 92-97.
- 26 Toniolli R., Barros T.B., Toniolli L.C., Guimarães D.B., Freitas E.N. & Nunes T.G.OP. 2016. Diferentes concentrações de gema de ovo em pó adicionada ao diluente ACP-103® na conservação do sêmen de suíno. *Ciência Animal Brasileira*. 17(2): 243-251.
- 27 Viana A.K.S., Chalhoub M., Ribeiro Filho A.L., Almeida A.K., Portela A.P.M., Bittencourt R.F., Alves S.G.G., Bittencourt T.C.C. & Quintela A.T. 2006. Avaliação *in vitro* do sêmen caprino resfriado, com ou sem centrifugação do plasma seminal e diluído em leite-desnatado-glicose e tris-gema de ovo. *Ciência Animal Brasileira*. 7: 67-76.
- 28 Souza W.L., Moraes E.A., Costa J.M.S., Sousa P.H.F., Lopes Junior E.S., Oliveira R.P. & Toniolli R. 2016. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 36(7): 657-664.