

PAULA PICCOLO MAITAN

**USO DE EQUICOLL-SMALL™ PARA FILTRAGEM DE SÊMEN  
CRIOPRESERVADO DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA  
MARCHADOR, COM DIFERENTES DILUENTES**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, para obtenção do título de  
*Magister Scientiae*

VIÇOSA  
MINAS GERAIS– BRASIL

2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

M232u  
2016 Maitan, Paula Piccolo, 1990-  
Uso de Equicoll-Small™ para filtragem de sêmen  
criopreservado de garanhões da raça Mangalarga  
Marchador, com diferentes diluentes / Paula Piccolo Maitan.  
- Viçosa, MG, 2016.  
ix, 54f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador : José Domingos Guimarães.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.37-54.

1. Cavalos - Reprodução. 2. Sêmen. 3. Coloide.  
4. Criopreservação. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação  
em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.108960473


PAULA PICCOLO MAITAN

**USO DE EQUICOLL-SMALL™ PARA FILTRAGEM DE SÊMEN  
CRIOPRESERVADO DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA  
MARCHADOR, COM DIFERENTES DILUENTES**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de julho de 2016.

  
Jurandy Mauro Penitente Filho

  
Eduardo Paulino da Costa  
(Coorientador)

  
Bruna Waddington de Freitas

  
José Domingos Guimarães  
(Orientador)

*“A verdadeira coragem está em ir atrás dos seus sonhos, mesmo quando todos dizem que eles são impossíveis”*

**(Cora Coralina)**

## AGRADECIMENTOS

Foram apenas dois anos, mas inúmeras pessoas a agradecer!

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças para levar esse período com muita dedicação e paciência. À minha família, devo o meu maior agradecimento. Ao meu pai Denizart e à minha mãe Angelina por terem me incentivado sempre, torcendo pelo meu sucesso. Aos meus irmãos Gabriela e Júlio pelo apoio, por serem meu porto seguro. A Cacai, por sempre achar que eu posso ir mais longe. Ao Torresmo, meu cachorro e saudoso amigo, por ser o meu maior confidente. Nunca terei palavras suficientes para agradecer tudo que fizeram por mim.

Um agradecimento imensamente importante devo ao meu orientador, JD, por enxergar que eu poderia ir além e me proporcionar a oportunidade de estudar mais. Pela ajuda no projeto, pois sem ele a ideia não seria elaborada e nem retirada do papel. Pelas aulas e pelas discussões que me tornaram uma profissional melhor. Pelas conversas e principalmente pela amizade que me tornaram uma pessoa melhor.

À Bruna Waddington devo uma referência especial. Suas dicas, conselhos, ajudas foram essenciais para execução do trabalho. Sem contar no grande laço que criamos. Muito obrigada Bruna, principalmente pela amizade.

À Camila e a Denise também meu muito obrigado. Sem a ajuda de vocês não teria chegado até aqui. A Camila que foi minha grande incentivadora e amiga desde a graduação e a Denise por ter se tornado uma grande amiga na pós.

Ao Jura, por ter tido uma imensa paciência comigo durante a análise e interpretação dos dados, além das dicas para aprimorar o trabalho!

Aos funcionários do NMM por me aturarem por muitos e muitos dias e por terem tido muita paciência quando eu extrapolava o tempo um pouquinho. Em especial Gilmar, Karla, Carlota, Lourenço agradeço a atenção e a ajuda que me deram durante todo esse tempo.

De modo especial agradeço ao professor Leandro Licursi. Sua paciência e ajuda no citômetro foram essenciais para que eu pudesse entender, aprender e executar grande parte do meu projeto.

À Rosi, secretária/mãe da pós graduação eu dedico um agradecimento mais que especial. Obrigada Rosi por ser esclarecedora de todas as dúvidas, por resolver todos os problemas quando achamos que eles não podiam ser resolvidos, por ser sempre essa “mãezona” protetora e grande amiga de todos nós, tornando a pós graduação uma grande família.

Aos colegas da Reprodução Animal que tenho um grande prazer em chamar de AMIGOS. Sem eles, esses dois anos não teriam sido especiais como foram. Além da grande ajuda de muitos, agradeço a amizade formada que levarei para vida. Muito obrigada Bruna, Camila, Denise, Faider, Daniel,

Breno, Jura, Victor, Camilo, Edgar, Thiago e Amanda. Obrigada pessoal pelas cervejinhas e pelo companheirismo!

Aos professores do DVT pelos ensinamentos, em especial o Prof. Eduardo Paulino, pelas contribuições durante todo o mestrado e durante a defesa. Aos funcionários do departamento por toda ajuda em especial ao seu Didi.

À Botupharma, por ceder material para o experimento. À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E por fim agradeço eternamente à Universidade Federal de Viçosa, por ser a minha casa a mais de sete anos e por me proporcionar os melhores momentos da minha vida!

**MUITO OBRIGADA!**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
2.1. Criopreservação do sêmen equino .....	3
2.2. Crioprotetores.....	5
2.2.1. Glicerol.....	6
2.2.2. Dimetilformamida .....	7
2.3. Centrifugação em camada única .....	8
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
3.1. Animais .....	9
3.2. Coleta de sêmen .....	9
3.3. Delineamento experimental .....	10
3.4. Centrifugação com o Equicoll-Small™ .....	10
3.5. Congelamento e descongelamento de sêmen.....	11
3.6. Análise de características espermáticas via citometria de fluxo .....	12
3.6.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (PI/FITC-PSA) .....	13
3.6.2. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1) .....	15
3.6.3. Avaliação da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> intracelular (DCFDA/PI).....	17
3.6.4. Avaliação da desorganização da bicamada lipídica (M540/PI) .....	20
<b>4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS</b> .....	<b>21</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>22</b>
5.1 Motilidade e vigor do sêmen fresco e descongelado .....	22
5.2. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal .....	23
5.3. Avaliação da desorganização da bicamada lipídica .....	26
5.4. Avaliação do potencial mitocondrial .....	28
5.5. Avaliação da produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> intracelular .....	30
5.6. População espermática recuperada pós SLC (rendimento espermático) .....	34
5.7. Comparação do sêmen centrifugado com o sobrenadante .....	35
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>37</b>

## RESUMO

MAITAN, Paula Piccolo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016.  
**Uso de Equicoll-Small™ para filtragem de sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador, com diferentes diluentes.**  
Orientador: José Domingos Guimarães. Coorientadores: Eduardo Paulino da Costa e Maria Verônica de Souza.

O aumento do uso da inseminação artificial (IA) em equinos com sêmen congelado necessita de estudos que possibilitem a melhora da qualidade dos espermatozoides criopreservados e diminua a variabilidade individual entre os garanhões quanto à congelabilidade dos ejaculados. Isto porque as taxas de fertilidade obtidas com o sêmen equino criopreservado são inferiores às aquelas obtidas com o sêmen fresco e refrigerado dessa espécie e ao sêmen bovino criopreservado. Este estudo visou verificar a ação de diferentes crioprotetores adicionados ao diluente além da eficácia da solução coloidal Equicoll-Small™ na filtragem do sêmen equino pós-descongelamento no intuito de se obter uma população espermática com menor concentração de patologias e com maior número de características favoráveis à fecundação. Foram utilizados quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador, hípidos e com históricos reprodutivos normais. Após o descongelamento, as amostras de sêmen foram submetidas ou não à centrifugação com o Equicoll-Small™, e avaliadas por meio de sondas fluorescentes através da citometria de fluxo. A maioria dos parâmetros espermáticos mostrou melhora após a centrifugação em camada única (SLC) com o Equicoll-Small™ ( $P < 0,05$ ). No pós-descongelamento as amostras de sêmen criopreservadas em diluentes com o crioprotetor glicerol mostraram piores resultados comparadas às amostras de sêmen criopreservadas em diluentes com outros crioprotetores (DMFA e DG) em relação à integridade de membrana plasmática e organização da bicamada lipídica ( $P < 0,05$ ). O uso do coloide propiciou a recuperação de uma população espermática com melhor integridade de membrana, maior organização da bicamada lipídica, menor potencial mitocondrial e menor integridade acrossomal ( $P < 0,05$ ). O rendimento espermático médio foi de 6,95 % ( $\pm 0,91$

%). Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o uso de diluentes com os crioprotetores DMFA e DG mostraram ser mais eficazes em manter a viabilidade espermática *in vitro* em comparação ao diluente com o crioprotetor glicerol no pós-descongelamento. Além disso, o uso do Equicoll-Small™ se mostrou eficaz na obtenção de uma população espermática viável, principalmente nas amostras de sêmen com maior porcentagem de crioinjúrias, porém seu rendimento espermático (concentração espermática final inseminante) pode ser um fator limitante para o uso desta técnica como rotina.

## ABSTRACT

MAITAN, Paula Piccolo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Use of Equicoll-Small™ for filtering cryopreserved semen with different extenders of stallions of Mangalarga Marchador breed.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-Advisers: Eduardo Paulino da Costa and Maria Verônica de Souza.

The use of artificial insemination (AI) in horses with frozen semen requires efforts to increase the quality of cryopreserved spermatozoa and decrease individual variability among stallions as their ejaculates freezeability. This is because of fertility rates obtained from cryopreserved stallion semen are lower than those obtained with fresh and cooled semen of this species and of cryopreserved bovine semen. This study aimed to verify the action of different cryoprotectants added to the diluent in addition to the effectiveness of the colloidal solution Equicoll-Small™, in filtering the stallion semen post-thawing in order to obtain a sperm population with lower concentrations of pathologies and with more favorable fertilization characteristics. Four healthy stallions of Mangalarga Marchador breed with normal reproductive historic were used. After thawing the semen samples were subjected or not to centrifugation with Equicoll-Small™ and evaluated by fluorescent dyes via flow cytometry. Most sperm parameters showed improvement after Single Layer Centrifugation (SLC) with Equicoll-Small™ ( $p < 0.05$ ). After thawing the treatment with glycerol showed worse results compared to others cryoprotectants (dimethylformamide and dimethylformamide+glycerol) in relation to the integrity of the plasma membrane and organization of the lipid bilayer ( $P < 0.05$ ). SLC recovered a sperm population with better membrane integrity, better organization of the lipid bilayer, lower mitochondrial potential and lower acrosomal integrity ( $P < 0.05$ ). The average of the sperm yield was 6.95% ( $\pm 0.91\%$ ). Based on these results, it is concluded that the treatments with dimethylformamide and dimethylformamide + glycerol are shown to be more effective in maintaining the sperm viability *in vitro* when compared to the glycerol after thawing. In addition, it was concluded that the SLC with Equicoll-Small™ is effective in obtaining a

viable sperm population, especially in those samples that show more cryoinjuries, but its sperm yield can be a limiting factor for the technique.

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse pela comercialização do sêmen congelado de garanhões tem aumentado no intuito de otimizar o uso de animais zootecnicamente superiores aumentando os ganhos genéticos por meio dos programas de melhoramento animal. Porém, há necessidades de novos estudos sobre criopreservação do sêmen, visto que o uso desta biotecnologia é uma importante ferramenta para a difusão de genótipos superiores (CHOI et al., 2002; LOOMIS et al., 2008). Com isso o aumento do uso da inseminação artificial (IA) com sêmen congelado necessita de esforços que aumentem a qualidade do sêmen e diminua a variabilidade individual entre os garanhões na congelabilidade de seus ejaculados (LOOMIS et al., 2008).

O sucesso da criopreservação do sêmen de garanhões é considerado menor quando comparado ao sêmen bovino (AMANN et al., 1987; WATSON et al., 2000). Este fato pode ser atribuído à falta de seleção para fertilidade na espécie equina (PIMENTEL, 1989), visto que os garanhões são selecionados basicamente por sua raça, desempenho atlético ou outra característica fenotípica (BRITO, 2007; VARNER et al., 2008).

Para manter a capacidade de fertilização, os espermatozoides, após a criopreservação, devem conservar características como manutenção do metabolismo para produção de energia; motilidade progressiva; integridade de membrana; enzimas acrossomais funcionais, que são essenciais tanto para o processo de fecundação quanto para a manutenção da sobrevivência dos espermatozoides no órgão genital feminino. A perda de componentes espermáticos associados a uma ou mais dessas características reduz ou mesmo anula a fertilidade dos espermatozoides (AMANN et al., 1987). Em função disso, a adição de crioprotetores ao diluente é feita na tentativa de diminuir os danos causados pelo processo de criopreservação do sêmen.

O glicerol foi o primeiro crioprotetor usado na criopreservação de sêmen, porém apresenta efeitos tóxicos aos espermatozoides de garanhões (FAHY, 1983; HAMMERSTEDT et al., 1992; FAHY, 2010; MACÍAS-GARCÍA et al., 2012a), levando à baixa fertilidade do sêmen resfriado e congelado (PACE et al., 1975; DEMICK et al., 1976; BEDFORD et al., 1995; VIDAMENT et al.,

2009). Dessa forma, a pesquisa por crioprotetores menos tóxicos ao sêmen é necessária para aumentar os índices de fertilidade do sêmen de garanhões.

Uma potencial alternativa ao glicerol são as amidas (MEDEIROS et al., 2002; CARMO et al., 2005; SAMPER et al., 2008). Keith (1998) ao comparar diferentes amidas como crioprotetores para preservação do sêmen equino, observou que a metilformamida e a dimetilformamida (DMFA) resultaram em maior porcentagem de motilidade espermática no pós-descongelamento. Alvarenga et al. (2000) ao comparar glicerol, DMSO (dimetilsulfóxido), etilenoglicol e dimetilformamida observaram que a dimetilformamida foi superior na maioria dos ejaculados para preservar a motilidade espermática no pós descongelamento. Medeiros et al. (2002) compararam diversas amidas na criopreservação do sêmen de garanhões e observaram que todos os diluentes contendo as amidas como crioprotetores foram superiores ao diluente contendo o glicerol em relação a habilidade de proteger as células espermáticas das injúrias causadas durante o processo de criopreservação.

Squires et al. (2004) concluíram que a DMFA sozinha ou associada com o glicerol no diluente, propicia melhor motilidade no pós descongelamento que o glicerol sozinho no diluente. Vidament et al. (2002) compararam a motilidade espermática no pós-descongelamento e a fertilidade de sêmen congelado de garanhão com uso de glicerol e DMFA, associados ou não no diluente, e concluíram que a combinação dos crioprotetores resultam em maiores percentuais de espermatozoides viáveis quando comparados ao uso de glicerol sozinho no diluente.

Outra alternativa para aumentar as taxas de fertilidade do sêmen equino é o uso de uma solução coloidal capaz de separar por filtração os espermatozoides viáveis dos não viáveis. Essa metodologia vem sendo utilizada em maior escala em sêmen fresco e refrigerado (MORRELL et al., 2008; MORRELL et al., 2009a; LINDAHL et al., 2012), e em menor escala no sêmen congelado de garanhões (MARCÍAS GARCIA et al., 2009) com o Androcoll-E™.

O Equicoll-Small™ é um coloide de sílica espécie específica, desenvolvido na *Swedish University of Agricultural Sciences* utilizado para melhorar a qualidade do ejaculado equino por meio de uma centrifugação em

camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*) separando os espermatozoides de morfologia normal e com boa motilidade espermática, dos lesionados ou mortos e das bactérias (MORREL et al., 2008).

Os espermatozoides do ejaculado fresco que passam pela centrifugação em camada única mantêm a motilidade espermática e a cromatina íntegra por mais tempo que aqueles que não foram centrifugados com o coloide de sílica podendo reter sua capacidade fertilizante por maior período. Porém, a porcentagem de espermatozoides recuperados após a centrifugação de camada única varia consideravelmente entre os ejaculados dos garanhões (MORRELL et al., 2009b).

Diante do exposto, objetiva-se com esse estudo verificar a ação de diferentes crioprotetores (glicerol e dimetilformamida, associados ou não) adicionados ao diluente de sêmen equino, bem como avaliar a eficácia da nova solução coloidal, o Equicoll-Small™, criada com o objetivo de ser utilizada na filtragem do sêmen pós-descongelamento de garanhões.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Criopreservação do sêmen equino**

Diversas vantagens podem ser destacadas com a criopreservação do sêmen equino tais como: uso de animais geneticamente superiores; facilidade do transporte e disseminação do material genético, evitando o estresse do transporte tanto para o garanhão quanto para a fêmea a ser coberta; a continuidade da estação de monta do garanhão, quando esse apresenta um baixo desempenho ou está se recuperando de alguma doença ou lesão; inexistência da diferença de estação de monta entre os hemisférios norte e sul; utilização do material genético do animal após a sua morte; controle de doenças sexualmente transmissíveis; uso para a biotecnologia de injeção espermática intracitoplasmática entre outras (AMANN et al., 1987; CHOI et al., 2002; LOOMIS et al., 2008).

Entretanto, o uso do sêmen congelado ainda é bastante limitado devido tanto ao processo de criopreservação quanto à diferença dos ejaculados entre os garanhões. Outro fator limitante é a baixa tolerância do espermatozoide

equino ao processo de criopreservação e descongelamento. Já foi comprovado que o fator raça afeta diretamente na tolerância dos espermatozoides ao processo de criopreservação. A raça Mangalarga Marchador mostrou resultados inferiores na congelabilidade do sêmen quando comparadas com raças como Quarto de Milha e raças de cavalo de salto (FAGUNDES et al., 2011).

O processo de criopreservação causa danos aos espermatozoides tais como queda da produção de energia, diminuição da motilidade, aumento da permeabilidade da membrana, perda de moléculas e íons intracelulares e alterações morfológicas (AMANN et al., 1987; BAILEY et al., 2000). Várias organelas espermáticas também são afetadas nesse processo podendo causar reação acrossomal prematura, alteração da função mitocondrial, falha na descondensação da cromatina afetando a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides (COOTER et al., 2005; CHAVEIRO et al., 2006; WONGTAWAN et al., 2006).

Antes do congelamento, o sêmen é resfriado, etapa na qual ocorre a fase de transição (até 5°C), que é caracterizada pela passagem da membrana espermática do estado líquido/cristalino para uma fase em gel (AMANN et al., 1987; LOOMIS et al., 2008). Nesta fase ocorrem alterações que impedem a movimentação lateral dos fosfolipídios da membrana espermática, resultando na formação de pequenas regiões de lipídio no estado líquido onde proteínas se aderem. Os danos causados nessa fase culminam com o denominado choque térmico. Essa agregação proteica resulta tanto no aumento da permeabilidade de membrana quando no decréscimo da atividade metabólica (HAMMERSTEDT et al., 1992).

Durante o congelamento do sêmen há duas faixas de temperatura que são consideradas críticas: de 0 a -5°C, período denominado super-resfriamento; e de -6 a -15°C, onde ocorre a formação de cristais de gelo (WOELDERS, 1997). Se realizada em alta velocidade, o super-resfriamento resulta em rápida formação de gelo com a possibilidade de causar danos físicos a célula, e, a formação de cristais de gelo, alterando a função espermática no pós-descongelamento (LEMMA, 2011).

A formação de cristais de gelo resulta em maior concentração de soluto extracelular. A célula responde a esse processo perdendo água e diminuindo de tamanho para equilibrar a concentração de solutos entre o meio intra e extracelular (POMMER et al., 2002a; SCHERZER et al., 2009). Esse processo pode resultar em dois efeitos prejudiciais aos espermatozoides: se a taxa de resfriamento for lenta, a membrana espermática fica exposta muito tempo às altas concentrações de soluto extracelular podendo levar à extração de proteínas e lipídeos e à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), por outro lado, se a taxa de resfriamento for rápida, o teor de água citoplasmática se mantém alto levando à formação de cristais de gelo intracelular, podendo ser letal aos espermatozoides (HOLT & PENFOLD, 2014).

Outro processo que afeta a viabilidade espermática é o processo de descongelamento. Este tem sido mais relacionado aos danos causados aos espermatozoides que a formação de cristais de gelo intracelular (MORRIS et al., 2012).

Uma forma de aumentar o sucesso da criopreservação é a adição de crioprotetores ao diluente. Os crioprotetores são componentes que atuam especificamente na manutenção da viabilidade celular durante o processo de congelamento/descongelamento (GILMORE et al., 1997) com o objetivo de proteger as biomoléculas e estruturas intracelulares. Além disso, os agentes crioprotetores ampliam a taxa de resfriamento ótima o que pode resultar em maior sobrevivência espermática (SIEME et al., 2016).

Sendo assim, o sucesso da criopreservação depende de diversos fatores incluindo interação com crioprotetores, tipo de diluente, protocolo de congelamento ou taxa de resfriamento e congelamento, taxa de descongelamento, assim como a variação individual dos ganhadores doadores de sêmen (ANDRABI et al., 2007; CLULOW et al., 2008).

## **2.2.Crioprotetores**

A eficácia do crioprotetor depende da sua capacidade de proteger as células contra as injúrias causadas pela criopreservação, tal como efeito tóxico sobre as mesmas. Essa capacidade é dependente do número de pares de

cadeias simples de elétrons que contém os crioprotetores, a simetria esférica destas cadeias e sua solubilidade na água (NASH, 1966).

Os crioprotetores podem ser divididos em permeáveis e não permeáveis, dependendo de sua ação. Crioprotetores permeáveis são capazes de penetrar na membrana espermática e agir no compartimento intracelular, embora também possuam efeito no meio extracelular. Já os crioprotetores não permeáveis agem somente no meio extracelular (PICKETT & AMANN, 1993; LEIBO & BRADLEY, 1999; LEMMA, 2011).

Crioprotetores permeáveis são normalmente moléculas pequenas e não iônicas. Pertencem a classe os álcoois (como o glicerol) e as amidas (dimetilformamida) (ASHWOOD-SMITH, 1987; SQUIRES et al., 2004). O crioprotetor é considerado ideal quando, ao penetrar a membrana plasmática, não provoca desidratação brusca, lesão celular, e, ao mesmo tempo, não seja tóxico nas concentrações necessárias para evitar esses efeitos deletérios da criopreservação (FAHY, 1986; FAHY et al., 1987)

### **2.2.1. Glicerol**

Trata-se de um álcool poli-hídrico, com seis sítios de ligação com a molécula de água (SILVA et al., 2003). Mesmo possuindo baixa permeabilidade (GLAZAR et al., 2009) comparada a outros crioprotetores como as amidas, o glicerol é considerado eficiente por tornar mais lenta a desidratação celular durante a criopreservação ao se ligar fortemente a água (DOEBBLER, 1966).

Apesar de ser o crioprotetor mais comum utilizado na criopreservação de sêmen, seu uso pode causar danos à membrana espermática pelo efeito osmótico e pela ruptura do citoesqueleto de actina (MACÍAS-GARCÍAS et al., 2012a). Seu uso também está associado à baixa motilidade e fertilidade dos espermatozoides pós-descongelamento na espécie equina (ALVARENGA et al., 2005).

Além disso, o glicerol em elevadas concentrações é considerado tóxico, fator limitante para o sucesso da criopreservação (FAHY, 2010). Esse efeito tóxico se deve parcialmente ao fato do estresse osmótico, pois o glicerol penetra na membrana celular mais devagar que outros crioprotetores (GILMORE et al., 1995). Hammerstedt & Graham (1992) demonstraram que os

efeitos do glicerol sobre os espermatozoides incluem mudanças nos eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade intracelular, alteração da polimerização da tubulina, alteração da associação dos microtúbulos e do glicocálix. O efeito tóxico do glicerol também está associado à desnaturação de proteínas, despolimerização e redistribuição da actina, alteração do potencial mitocondrial e lesões na membrana plasmática (MACIAS-GARCIA et al., 2012a).

Devido à sua alta toxicidade, a concentração de glicerol deve estar entre a mínima necessária para promover a proteção, e a máxima permitida para não causar danos aos espermatozoides (COTORELLO & HENRY, 2002). Na espécie equina, a concentração de glicerol usada na criopreservação de sêmen está entre 2 e 5% (VIDAMENT, 2000; LOOMIS et al., 2008).

### **2.2.2. Dimetilformamida**

Por ter peso molecular menor comparado ao glicerol, as amidas tendem a induzir menor estresse osmótico aos espermatozoides durante o processo de criopreservação por penetrarem na membrana espermática com mais facilidade (SQUIRES et al., 2004). Squires et al. (2004) e Alvarenga et al. (2005) demonstraram que as amidas protegem tanto a estrutura quanto a função dos espermatozoides equino durante a criopreservação e descongelamento.

O uso das amidas resultou em aumento na motilidade espermática pós-descongelamento e preservação da integridade de membrana em relação ao glicerol, sendo uma alternativa de uso para ejaculados de garanhões que congelam mal quando o glicerol é usado como crioprotetor (classificados como “maus congeladores”) (ALVARENGA et al., 2005).

Olaciregui et al. (2014) demonstraram que a dimetilformamida é um crioprotetor adequado para criopreservação de sêmen do epidídimo de equino, sendo superior ao glicerol nesse processo. Já Álvarez et al. (2014) observaram que a associação da dimetilformamida (2,5%) com o glicerol (2,5%) obteve melhores resultados na avaliação da motilidade e viabilidade espermática e integridade acrossomal ao congelar sêmen do epidídimo de garanhões. Porém esses mesmos autores ao congelar o ejaculado de garanhões observaram

melhores resultados no pós-descongelamento quando utilizaram a dimetilformamida a 5% ou a associação da dimetilformamida (2,5%) com o glicerol (2,5%).

### **2.3. Centrifugação em camada única**

Para que a IA resulte em prenhez, a dose inseminante deve conter quantidade suficiente de espermatozoides viáveis capaz de atingir o sítio de fecundação. Uma alternativa para aumentar esta concentração espermática é selecionar os espermatozoides com maior capacidade de fertilização do restante do ejaculado (MORRELL & RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009).

A centrifugação com gradiente de densidade vem sendo usada há muitos anos para melhorar a qualidade do sêmen humano como o uso nas biotécnicas de fertilização *in vitro* (FIV), injeção espermática intracitoplasmática (ICSI) e ocasionalmente deposição intra uterina do sêmen (DONNELLY et al., 2000; SAKKAS et al., 2000). Na FIV de bovinos essa técnica também é utilizada (RODRIGUEZ- MARTINEZ et al., 1997; SAMARDZIJA et al., 2006), porém não viável para a IA nas outras espécies, devido à falta de protocolos adequados e a dificuldade no processamento de grandes volumes de ejaculado de algumas espécies (MORRELL, 2006).

O coloide de sílica utilizado para filtragem do sêmen por meio de uma centrifugação em camada única, não penetra na membrana espermática não estressando osmoticamente os espermatozoides, tem baixa viscosidade permitindo a sedimentação seletiva dos espermatozoides (MORTIMER, 2000; PERTOFT, 2000).

A amostra de um ejaculado classificado como ruim com taxas de prenhez menores que 20%, após a centrifugação de camada única gera maior número de prenhez por IA (MORRELL et al., 2011). Além disso, a concentração espermática selecionada, após a utilização do coloide de sílica, de um garanhão com problemas de fertilidade conhecidos é capaz de fertilizar após ser estocada e refrigerada por cinco dias (LINDAHL et al., 2012).

O uso das soluções coloidais também foi estudado em outras espécies, obtendo-se sucesso como nos cães, onde foram obtidos espermatozoides com melhores padrões de motilidade após a centrifugação de camada única com o

Androcoll-C (DORADO et al., 2013). Também já foi utilizado em javalis, onde a utilização do coloide Androcoll-P resultou em ejaculado com espermatozoides de morfologia normal e melhor motilidade (VAN WIENEN et al., 2011).

### **3. MATERIALE MÉTODOS**

#### **3.1. Animais**

Foram utilizados quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade entre quatro e quinze anos e peso corporal de 400 a 500 Kg. Os animais foram provenientes do Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, do Haras Barreiro e do Haras Recreio, todos situados no município de Viçosa (latitude 20° 45" Sul, longitude 42° 52" Oeste), altitude média de 752 m e clima predominante do tipo tropical mesotérmico brando úmido, segundo Coelho & Da-Silva (2003). As coletas de sêmen foram realizadas no período de setembro a novembro de 2015, durante o período reprodutivo da espécie.

Durante todo o período experimental, os animais permaneceram alojados em baias (16 a 25 m<sup>2</sup>) e soltos diariamente em piquetes de capim *coastcross* e/ou tifton (*Cynodon* spp.), de 225 m<sup>2</sup>, no período de 08:00 às 14:00. A alimentação foi oferecida duas vezes ao dia, de acordo com o manejo do local de procedência dos animais. Foram oferecidos água e sal mineral *ad libitum*. O controle de ecto e endoparasitas foram realizados de acordo com o programa sanitário do estabelecimento.

Os animais foram previamente submetidos à avaliação andrológica para análise das características seminais, que apresentaram valores mínimos de 60% de motilidade espermática progressiva e 3 de vigor espermático. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa – CEUA/ UFV (protocolo 08/2015, aprovado no dia 30/06/2015).

#### **3.2. Coleta de sêmen**

As coletas de sêmen foram realizadas por meio de vagina artificial (modelo Botucatu), previamente preparada com água a 45°C. Após as coletas,

a fração gel dos ejaculados foi retirada por filtração e a avaliação imediata foi realizada considerando o aspecto, coloração, volume, concentração espermática, motilidade espermática progressiva total e vigor espermático. O volume foi aferido em proveta graduada de 250 mL, previamente aquecida a 37°C. A motilidade espermática progressiva total (%) e o vigor espermático (escore: 0 - 5) foram observados por microscopia de Luz, com aumento de 200x, utilizando-se 20 µL de sêmen disposto entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C. Uma alíquota de 50 µL de sêmen foi diluída em 950 µL de água destilada (proporção 1:20) para determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer. Cada ejaculado coletado conteve no mínimo  $2,5 \times 10^9$  espermatozoides.

### **3.3. Delineamento experimental**

Totalizaram-se cinco coletas por animal e cada ejaculado foi dividido nos diferentes tratamentos. Para o congelamento dos ejaculados, foi utilizado o meio comercial Botu-Crio<sup>®</sup> sem crioprotetor, sendo esse o diluente base para os tratamentos 1 a 3, conforme segue:

- Tratamento 1 (GLIC): diluente base adicionado de glicerol (5 %);
- Tratamento 2 (DMFA): diluente base adicionado de dimetilformamida (5%);
- Tratamento 3 (DG): diluente base adicionado de glicerol (2%) e dimetilformamida (3%);
- Tratamento 4 (BC): Botu-Crio<sup>®</sup> comercial (grupo controle – glicerol a 1% associado à metilformamida a 4 %).
- Centrifugação ou não com o coloide Equicoll-Small<sup>™</sup> no pós-descongelamento

### **3.4. Centrifugação com o Equicoll-Small<sup>™</sup>**

Para centrifugação em camada única com o Equicoll-Small<sup>™</sup>, duas palhetas de sêmen de 0,5 mL foram descongeladas a 37 °C por 30 segundos. Foi utilizado 1 mL de sêmen a ser filtrado adicionado de 0,5 mL de diluente (BotuCrio<sup>®</sup> sem crioprotetor) (MORREL et al., 2008).

Uma coluna de 4 mL de suspensão da partícula de sílica espécie-específica (Equicoll-Small™) foi pipetada para um tubo Falcon de 15 mL. Logo após, 1,5 mL de solução contendo 1 mL de sêmen com 0,5 mL de BotuCrio® sem crioprotetor, não ultrapassando a concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, foi delicadamente depositado sobre a coluna da solução colóide. A centrifugação foi realizada a 300 g por 20 minutos (MARCIA GARCIA et al., 2009). Após a centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi separado em um microtubo plástico, com o objetivo de verificar a eficácia da filtração com a solução coloidal, enquanto o restante deste foi descartado. O pélete foi ressuspenso em 100 µL de BotuCrio® sem crioprotetor em outro microtubo plástico para análises posteriores.

A quantidade de espermatozoides foi avaliada antes e depois da centrifugação em camada única de solução coloidal, para se determinar o rendimento da população espermática separada.

### **3.5. Congelamento e descongelamento de sêmen**

Após as avaliações imediatas, o sêmen foi diluído em meio à base de leite desnatado (Botu-Sêmen®) na proporção 1:1 (uma parte de sêmen para uma parte de diluente), fracionado em tubos Falcon de 15 mL, para posterior centrifugação a 600 g por 15 minutos.

Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a concentração do pélete calculada em câmara de Neubauer. Após a determinação da concentração espermática, o pélete foi então homogeneizado com o diluente de congelamento do respectivo tratamento para uma concentração final de 50 milhões de espermatozoides por mL. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, devidamente identificadas, e então, refrigeradas a 5°C por 20 minutos, conforme Sampaio (2012). Após este período, as palhetas foram alocadas em vapor de nitrogênio, a 5 cm do nível da lâmina de nitrogênio líquido, por 15 minutos (LORENZONI, 2010) e posteriormente submersas em nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão criogênico.

As palhetas foram descongeladas em banho Maria 37 °C por 30 segundos.

### **3.6. Análise de características espermáticas via citometria de fluxo**

Foram feitas análises no pós-descongelamento pré e pós-centrifugação em camada única (SLC). Após a SLC foi feita análise tanto do sobrenadante quanto do pélete.

Essas análises foram realizadas em aparelho BD FACSVerse™ (Beckton-Dickeson®, SunnyVale, CA, USA), equipado com laser de argônio (azul – 488 nm de emissão com 20 mW de potência), laser UV (vermelho – 640 nm de emissão com 40 mW de potência) e filtros A (LongPass 507 nm / Band Pass 527/32 nm), B (LP 560 nm / BP 568/42 nm), C (LP 665 nm / BP 700/54 nm), D (LP 752 nm / BP 783/56 nm), E (LP 660 nm / BP 660/10 nm) e F (LP 752 nm / BP 783/56 nm).

Para o ajuste do aparelho, foram utilizadas amostras de sêmen resfriado de garanhão de fertilidade comprovada, diluídas em PBS a  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL. As partículas não espermáticas (debris) detectadas foram eliminadas, efetuando triagem sobre a população de interesse. Partículas com características de dispersão semelhantes às dos espermatozoides, mas sem conteúdo de DNA suficiente também foram excluídas.

As amostras foram primeiramente analisadas sem corantes, para que assim fosse determinado pela escala tamanho x granulosidade, o local específico onde se localiza a população espermática, sendo este estipulado como padrão para análise.

Para obter mais precisão, mais uma vez os espermatozoides e os debris puderam ser separados utilizando a metodologia descrita por Ricci et al. (2002), baseado não apenas na escala tamanho x granulosidade, mas também na característica fluorescente dos espermatozoides. Esse método foi realizado por meio do uso da sonda Iodeto de Propídeo, que cora apenas substâncias com conteúdo de DNA. Essa análise é importante em relação ao se utilizar sêmen congelado, uma vez que partículas de gema de ovo ou outro componente presente no diluente pode ser erroneamente confundido com espermatozoides.

Os testes foram repetidos até a obtenção adequada da triagem da população esperada e, com isso, o melhor ajuste (compensação) obtido para cada sonda foi estipulado como padrão.

### 3.6.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (PI/FITC-PSA)

A integridade da membrana plasmática espermática foi avaliada por meio da sonda iodeto de propídeo (PI), uma sonda impermeável à membrana, que cora o núcleo celular em vermelho quando a mesma encontra-se lesionada (MATYUS et al., 1984). Para avaliação da integridade acrossomal, foi utilizada a aglutinina *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA), uma sonda incapaz de penetrar a membrana acrossomal intacta, corando em verde somente aqueles espermatozoides reagidos ou com acrossoma lesionado (CROSS et al., 1986), ao se ligar em moléculas de  $\alpha$ -manose dispostas na matriz acrossomal (CELEGHINI et al., 2007).

Para esta avaliação no pós-descongelamento, foi seguido o protocolo proposto por Oliveira et al. (2012) modificado. Uma alíquota de 150  $\mu$ L de sêmen diluído em PBS (DMPBS - Flush, Nutricell<sup>®</sup>, Campinas, SP, Brasil) ( $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foi incubada com 10  $\mu$ L de FITC-PSA (100  $\mu$ g/mL de PBS, L-0770, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, MO, EUA) e 3  $\mu$ L de PI (0,5 mg/mL de PBS, P-4170, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, MO, EUA) em microtubos plásticos (2 mL) dispostos em banho Maria a 37°C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu$ L de PBS e a amostra destinada à leitura no aparelho.

Observaram-se quatro categorias celulares (Figura 1 e 2) de acordo com as combinações de lesão de membrana espermática e de acrossoma: (UL) FITC/PSA-PI+, que indica espermatozoides com membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro; (UR) FITC/PSA+PI+, que indica espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionadas; (LR) FITC/PSA+PI-, que indica espermatozoides com acrossoma lesionado e membrana plasmática íntegra; e (LL) FITC/PSA-PI-, que indica espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras.

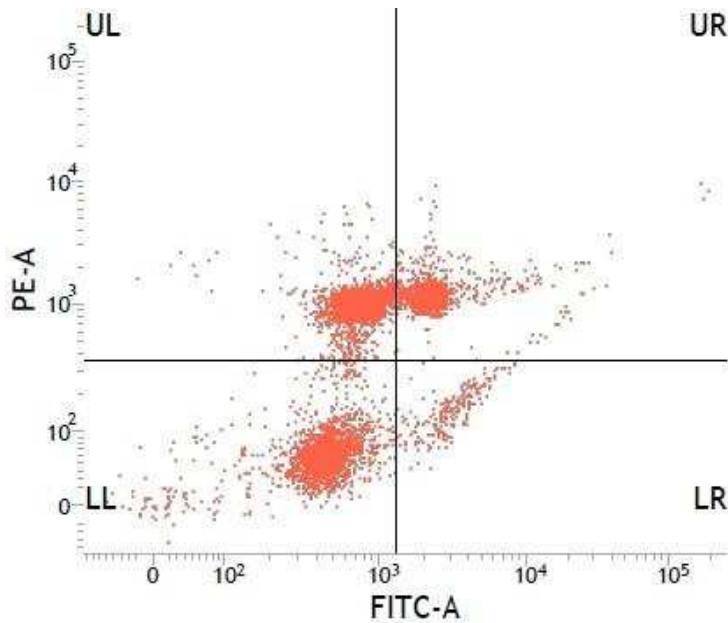


Figura 1: Pontos (*dot-plot*) gerados pela análise no citômetro de fluxo, de uma amostra de sêmen equino no pós-descongelamento corada com IP (PE-A) e FITC/PSA (FITC-A): LL, células viáveis; UL, células com membrana lesionada; UR, células com lesão na membrana plasmática e acrossomal; LR, células com acrossoma lesionado.

Para o pélete, uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de sêmen diluído em PBS (DMPBS - Flush, Nutricell<sup>®</sup>, Campinas, SP, Brasil) ( $1,5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foi incubada com 3  $\mu\text{L}$  de FITC-PSA (100  $\mu\text{g/mL}$  de PBS, L-0770, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, MO, EUA) e 1  $\mu\text{L}$  de PI (0,5 mg/mL de PBS, P-4170, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, MO, EUA) em microtubos plásticos (1,5 mL) dispostos em banho Maria a 37°C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de PBS e a amostra destinada à leitura no aparelho.

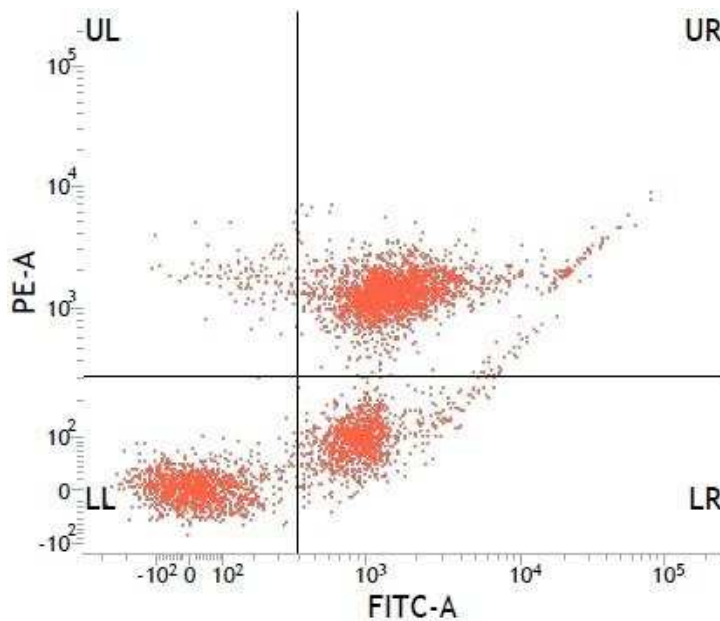


Figura 2: Pontos (*dot-plot*) gerados pela análise no citômetro de fluxo, do pélete de uma amostra de sêmen equino, corada com IP (PE-A) e FITC/PSA (FITC-A):LL, células viáveis; UL, células com membrana lesionada; UR, células com lesão na membrana plasmática e acrossomal; LR, células com acrossoma lesionado.

Todas as amostras tiveram 10.000 células analisadas, numa taxa de aproximadamente 200 células/segundo, nos filtros A (FITC-PSA – verde) e C (PI – vermelho) e excitação de 488 nm.

### 3.6.2. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1)

O potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) espermático foi avaliado mediante a utilização da sonda JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine iodide; T4069, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, MO, EUA). Essa sonda é um fluorocromo lipofílico que se acumula na mitocôndria de acordo com seu potencial de membrana. A fluorescência verde é característica da forma monomérica, que se acumula somente na mitocôndria despolarizada, com baixo potencial transmembrana ( $\Delta\Psi_m < 80-100$  mV). Quando o  $\Delta\Psi_m$  encontra-se acima de 80-100 mV, a fluorescência é emitida em laranja, em função da formação dos agregados de JC-1 na mitocôndria polarizada.

A análise do potencial mitocondrial foi determinada de acordo com protocolo proposto por Ortega-Ferrusolas et al. (2010) modificado. No pós-

descongelamento, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra previamente diluída em meio PBS ( $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foi incubada com 3  $\mu\text{L}$  JC-1 (153  $\mu\text{M}$  em DMSO; T4069, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, MO, EUA) por 40 minutos em banho Maria a 37°C. Após esse período a amostra foi destinada à leitura no aparelho.

Foi possível a classificação de células em duas categorias, com alto (UL,  $\Delta\Psi\text{m}$  alto) e baixo (LR,  $\Delta\Psi\text{m}$  baixo) potencial mitocondrial (Figura 3 e 4).

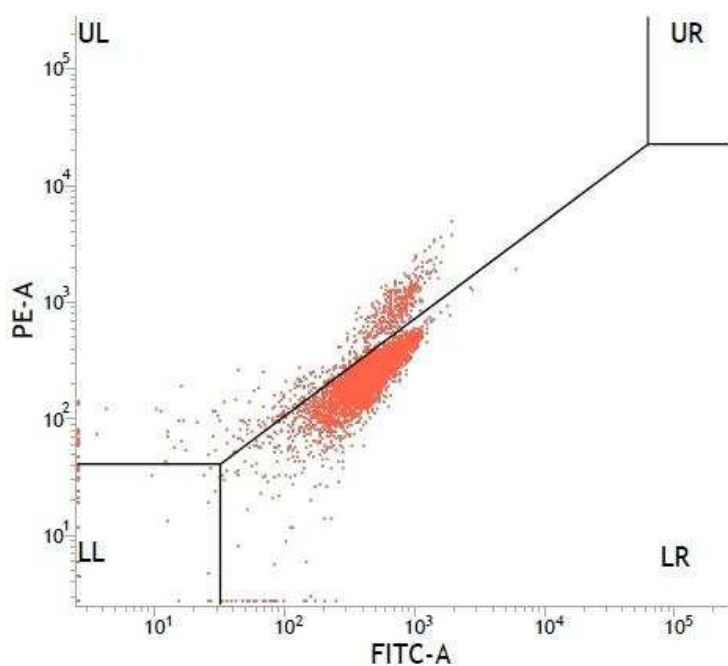


Figura 3: Pontos (*dot-plot*) gerados pela análise no citômetro de fluxo, de uma amostra de sêmen equino no pós-descongelamento corada com JC-1: espermatozoides com alto potencial mitocondrial (UL,  $\Delta\Psi\text{m}$  alto) e baixo potencial mitocondrial (LR,  $\Delta\Psi\text{m}$  baixo).

Para o pélete uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  de cada amostra previamente diluída em meio PBS ( $1,5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foi incubada com 1  $\mu\text{L}$  JC-1 (153  $\mu\text{M}$  em DMSO; T4069, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, MO, EUA) por 40 minutos em banho Maria a 37°C. Após esse período a amostra foi destinada à leitura no aparelho.

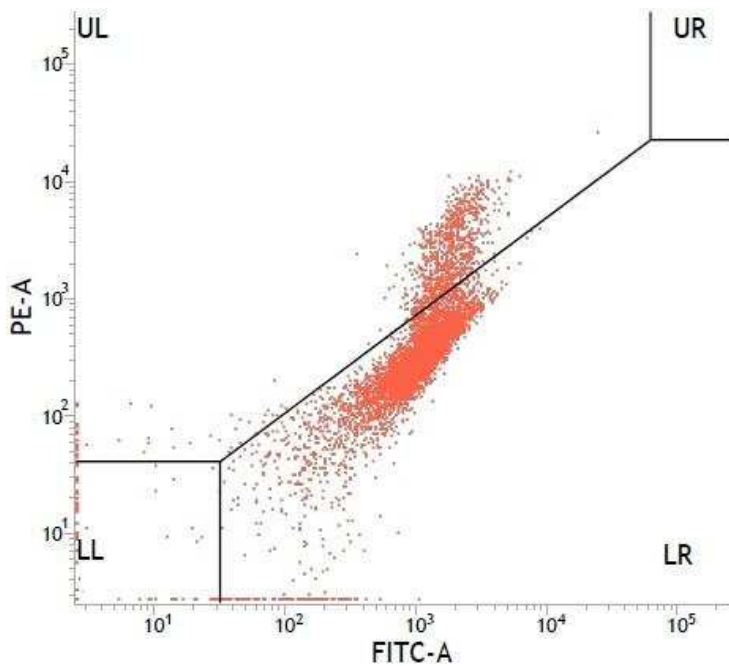


Figura 4: Pontos (*dot-plot*) gerados pela análise no citômetro de fluxo, do pélete de uma amostra de sêmen equino corada com JC-1: espermatozoides com alto potencial mitocondrial (UL,  $\Delta\Psi_m$  alto) e baixo potencial mitocondrial (LR,  $\Delta\Psi_m$  baixo).

Foram analisadas 10.000 células por amostra, em uma taxa de aproximadamente 200 células/segundo, com os filtros A (monômero – verde) e B (forma agregada – laranja) e excitação de 488 nm.

### 3.6.3. Avaliação da produção de $H_2O_2$ intracelular (DCFDA/PI)

A produção de peróxido de oxigênio intracelular foi avaliada mediante a utilização do fluoróforo diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFDA) que ao penetrar na célula, é oxidado pelo  $H_2O_2$  intracelular emitindo fluorescência verde.

Para avaliação da produção de  $H_2O_2$  intracelular foi seguido protocolo proposto por Marcias-Garcias et al. (2012). No pós-descongelamento, uma alíquota de 500  $\mu$ L da amostra diluída em meio PBS ( $5 \times 10^6$  espermatozoides /mL) foi adicionada a um microtubo (2,0 mL) aquecido em banho Maria a 37°C, e corada com 0,5  $\mu$ L DCFDA (1 mg/mL de DMSO, 2 mM; 35845, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, MO, EUA) durante 30 minutos. Após esse período, 150  $\mu$ L da amostra incubada foi retirada, colocada em outro tubo e corada com 3  $\mu$ L

de PI, permanecendo incubada por mais 5 minutos. Foram então adicionados 150  $\mu$ L de PBS e destinada a leitura no aparelho.

Foram observadas quatro populações celulares (figura 5 e 6): (UL) PI+DCFDA-, espermatozoides com membrana lesionada sem peróxido de hidrogênio intracelular; (UR) PI+DCFDA+, espermatozoides com membrana lesionada com peróxido de hidrogênio intracelular; (LR) PI-DCFDA+, espermatozoides com membrana íntegra com peróxido de hidrogênio intracelular; (LL) PI-DCFDA-, espermatozoides com membrana íntegra sem peróxido de hidrogênio intracelular.

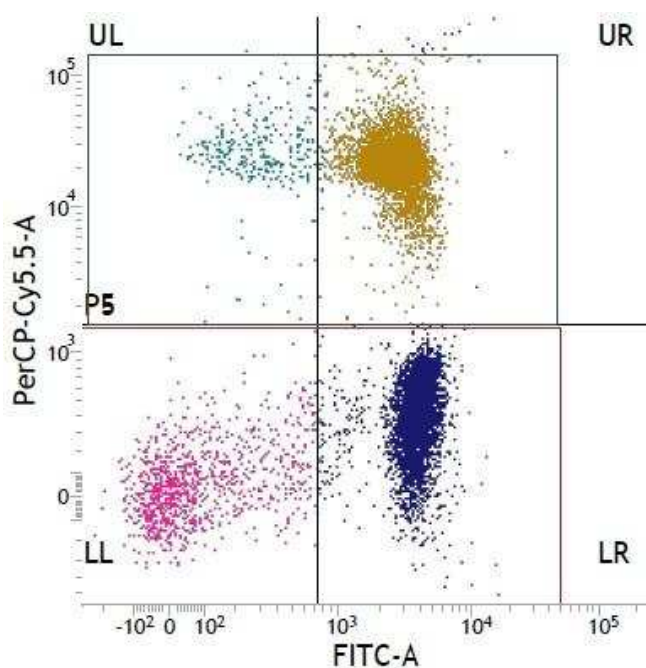


Figura 5: Pontos (*dot-plot*) gerados pela análise no citômetro de fluxo, de amostras de sêmen equino no pós-descongelamento, coradas com PI e DCFDA: LL, células com membrana plasmática íntegra sem peróxido de hidrogênio intracelular; UL, células com membrana lesionada sem peróxido de hidrogênio intracelular; UR, células com membrana lesionada com peróxido de hidrogênio intracelular; LR, células com membrana íntegra com peróxido de hidrogênio intracelular.

Para o pélete, uma alíquota de 150  $\mu$ L da amostra diluída em meio PBS ( $1,5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foi adicionada a um microtubo (1,5 mL) aquecido em banho Maria a 37°C, e corada com 0,2  $\mu$ L DCFDA (1 mg/mL de DMSO, 2 mM; 35845, Sigma-AldrichCo., Saint Louis, MO, EUA) durante 30 minutos. Após esse período, a amostra foi corada com 1  $\mu$ L de PI,

permanecendo incubada por mais 5 minutos. Foram então adicionados 150  $\mu\text{L}$  de PBS e destinada a leitura no aparelho.

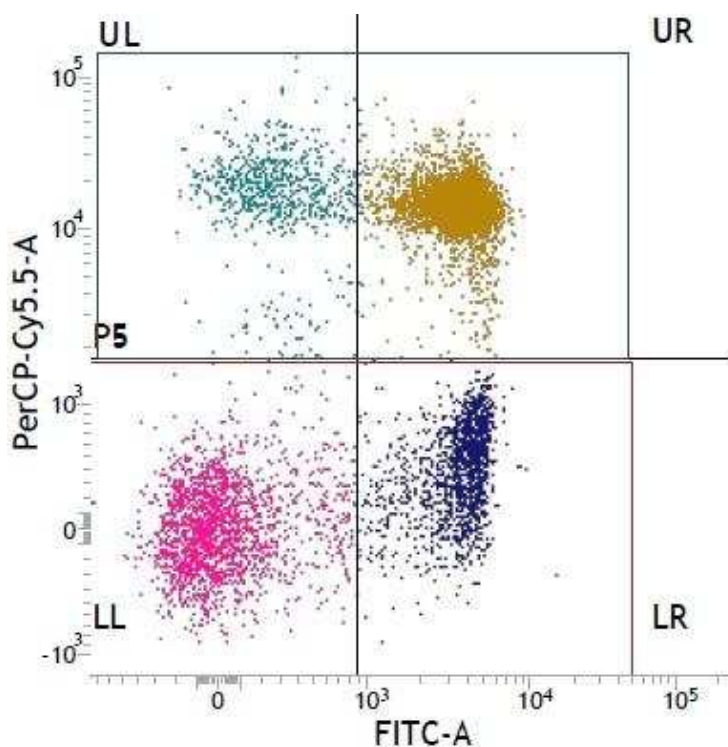


Figura 6: Pontos (*dot-plot*) gerados pela análise no citômetro de fluxo, do pélete de uma amostra de sêmen equino e corada com PI e DCFDA: LL, células com membrana plasmática íntegra sem peróxido de hidrogênio intracelular; UL, células com membrana lesionada sem peróxido de hidrogênio intracelular; UR, células com membrana lesionada com peróxido de hidrogênio intracelular; LR, células com membrana íntegra com peróxido de hidrogênio intracelular.

Foram contabilizadas 10.000 células, numa taxa de 400 células por segundo, com os filtros A (verde – DCFDA, células com alta produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular) e C (vermelho – células não viáveis).

A fim de quantificar a concentração de peróxido de hidrogênio intracelular, foi realizada análise do histograma quanto à média de emissão do fluoróforo DCFDA pelas células viáveis, captada no filtro A em relação a essa população.

### 3.6.4. Avaliação da desorganização da bicamada lipídica (M540/PI)

A desorganização da bicamada lipídica foi avaliada mediante a utilização das sondas merocianina (M540) e iodeto de propídeo (PI). A M540 é uma sonda lipofílica (EASTON et al., 1978) com alta afinidade por membranas instáveis (PAYAN-CARREIRA et al., 2013) utilizada para detectar a desorganização fosfolipídica na camada externa da bicamada da membrana plasmática (LANGNER & HUI, 1993), e conseqüentemente, o aumento da fluidez desta (PARTYKA et al., 2012).

Para análise da estabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides, no pós-descongelamento, uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  do sêmen diluído em meio PBS ( $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foi adicionada a um microtubo (2,0 mL) aquecido em banho Maria a  $37^\circ\text{C}$ , e corada com 0,5  $\mu\text{L}$  M540 (0,5 mg/mL de DMSO; M-24571, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e 3  $\mu\text{L}$  de PI durante 15 minutos. Após esse período foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de PBS na amostra e destinada a leitura no aparelho.

Em todas as amostras foi selecionada a população de células viáveis (íntegras) (LL) (figura 7a e 8a) e, a partir desta, quantificada a porcentagem de células com alta ou baixa desorganização de membrana (figura 7b e 8b).

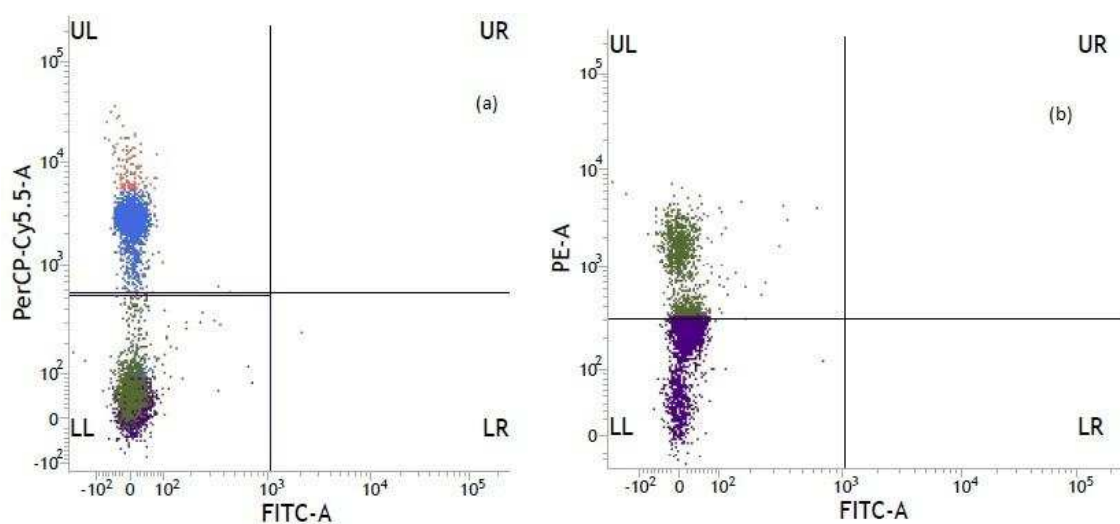


Figura 7: Pontos (*dot-plot*) gerados pela análise no citômetro de fluxo em amostra de sêmen equino no pós-descongelamento corada com M540 e PI. (a) Seleção da população de células viáveis (LL) (b) População de células viáveis com alta desorganização de membrana (UL – alta

fluorescência para M450) e baixa desorganização de membrana (LL – baixa fluorescência para M450).

Para o pélete uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do sêmen diluído em meio PBS ( $1,5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foi adicionada a um microtubo (1,5 mL) aquecido em banho Maria a  $37^\circ\text{C}$ , e corada com 0,2  $\mu\text{L}$  M540 (0,5 mg/mL de DMSO; M-24571, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e 1  $\mu\text{L}$  de PI durante 15 minutos. Após esse período, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de PBS na amostra, seguindo então, para leitura no aparelho.

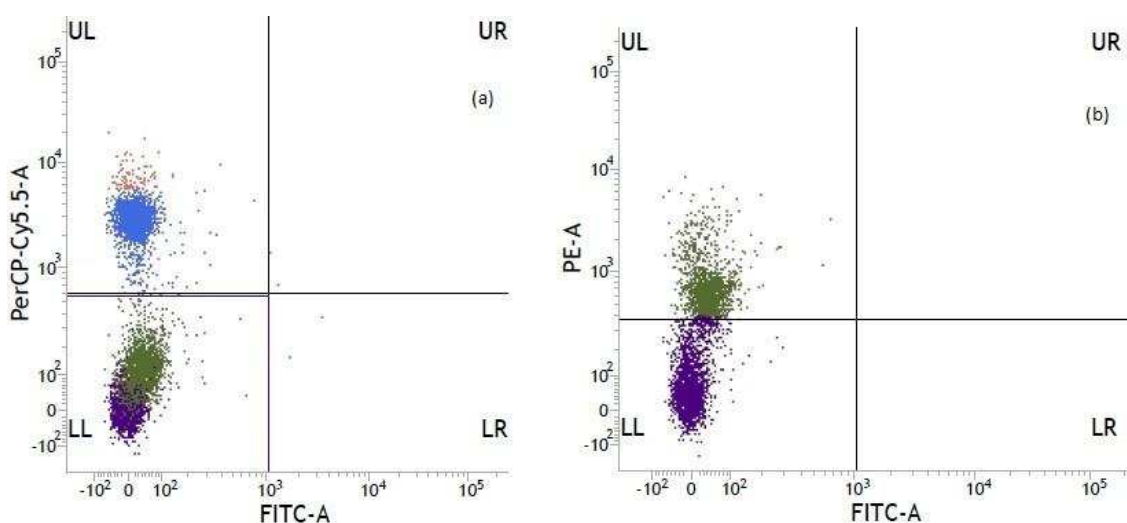


Figura 8: Pontos (*dot-plot*) gerados pela análise no citômetro de fluxo do pélete de uma amostra de sêmen equino, corada com M450 e PI. (a) Seleção da população de células viáveis (LL) (b) População de células viáveis com alta desorganização de membrana (UL – alta fluorescência para M450) e baixa desorganização de membrana (LL – baixa fluorescência para M450).

Foram contabilizadas 10.000 células, numa taxa de 400 células por segundo, com os filtros B (M540 – células com alta desorganização de membrana) e C (PI - vermelho – células não viáveis).

#### 4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em ensaio fatorial  $4 \times 2$  (quatro diluentes e com ou sem centrifugação), de acordo com o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + C_j + (DC)_{ij} + e_{ijk}$$

Em que:

$Y_{ijk}$  = resposta observada;

$\mu$  = constante geral;

$D_i$  = efeito referente ao diluente  $i$ ;

$C_j$  = efeito referente ao nível de centrifugação  $j$ ;

$(DC)_{ij}$  = interação;

$e_{ijk}$  = erro aleatório.

Os dados foram submetidos aos testes de Lilliefors e Bartlett para verificar a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias entre os tratamentos, respectivamente. Aqueles que atenderam as premissas da ANOVA foram analisados pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Duncan. Os dados que não atenderam as premissas da ANOVA foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis. O teste t pareado foi utilizado para comparar os resultados da citometria de fluxo das amostras entre a porção centrifugada e o sobrenadante. Para o estudo da relação entre as variáveis foi realizada análise de Correlação de Pearson. Adotou-se a probabilidade de erro de 5 %.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Motilidade e vigor do sêmen fresco e descongelado**

Para o congelamento do sêmen de garanhão é necessária a realização do exame andrológico para avaliar suas condições reprodutivas (JASKO, 1994). Um ejaculado está apto ao congelamento quando este apresenta após sua coleta pelo menos 50% de motilidade progressiva e no mínimo 60 milhões de espermatozoides/mL (ALVARENGA et al., 2005) e 3 de vigor (CBRA 2013). Todos os animais do estudo apresentaram os padrões mínimos para o congelamento de seus ejaculados (Tabela 1).

Tabela 1: Médias e erro padrão\* da motilidade, vigor e concentração espermática do sêmen fresco de garanhões da Raça Mangalarga Marchador

Característica	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Média
Motilidade total (%)	83,6 ± 1,8	82,2 ± 2,7	73,8 ± 4,7	70 ± 4,5	78,8 ± 1,9
Vigor (0-5)	3,8 ± 0,1	3,8 ± 0,2	3,8 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,7 ± 0,1
Concentração (x10 <sup>6</sup> /mL)	203,6±40,0	181,0±17,9	196,6±38,8	394,7±58,6	230,6±23,3

\* P<0,05

O espermatozoide equino é mais sensível ao processo de criopreservação comparado as outras espécies domésticas e, a raça Mangalarga Marchador entre outras raças, apresenta menor capacidade de criopreservação do sêmen além de uma variabilidade entre os indivíduos da espécie na congelabilidade de seus ejaculados (GOMES et al., 2002).

Na tabela 2 verifica-se que no pós-descongelamento houve uma redução da motilidade espermática em todos os tratamentos, sendo mais evidenciada no tratamento contendo o glicerol (78,3 vs 29,8 %) o que reforça a busca de crioprotetores alternativos para a criopreservação do sêmen de garanhões.

Tabela 2: Médias e erro padrão da motilidade e vigor espermático do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador criopreservado com diferentes diluentes no pós-descongelamento

Diluentes	Motilidade (%)	Vigor (0-5)
Glicerol	29,8±3,8 <sup>C</sup>	2,6±0,2 <sup>C</sup>
Dimetilformamida	53,1±3,3 <sup>AB</sup>	3,1±0,1 <sup>ab</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	57,4±3,5 <sup>A</sup>	3,3±0,1 <sup>a</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	45,9±4,3 <sup>B</sup>	3,0±0,1 <sup>bc</sup>

Letras maiúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna diferem entre si pelo teste de Waller Duncan (p<0,05); Letras minúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis (p<0,05).

## 5.2. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal

As amostras de sêmen criopreservadas e descongeladas em diluente contendo glicerol a 5 % apresentaram menor porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras em relação aos demais

crioprotetores. Após a centrifugação em camada única (SLC), as amostras de sêmen contendo apenas dimetilformamida e do grupo controle apresentaram redução no percentual de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras quando comparadas antes da centrifugação (tabela 3).

Tabela 3: Médias e erros padrão dos percentuais de espermatozoides criopreservados de equinos com membrana plasmática e acrossoma íntegros de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	15,2 ± 1,6 <sup>aB</sup>	21,9 ± 1,9 <sup>aA</sup>
Dimetilformamida	28,2 ± 2,7 <sup>aA</sup>	18,2 ± 2,6 <sup>bA</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	27,8 ± 2,0 <sup>aA</sup>	24,4 ± 3,7 <sup>aA</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	30,0 ± 2,2 <sup>aA</sup>	21,4 ± 2,1 <sup>bA</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

O uso da solução coloidal selecionou os espermatozoides com membrana plasmática íntegra, porém resultados contrários foram observados em relação à seleção para membrana acrossomal (tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Médias e erros padrão dos percentuais de espermatozoides criopreservados de equinos com membrana plasmática íntegra de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	16,6 ± 1,6 <sup>bB</sup>	44,1 ± 3,4 <sup>aB</sup>
Dimetilformamida	31,8 ± 2,9 <sup>bA</sup>	53,7 ± 4,6 <sup>aA</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	32,0 ± 2,0 <sup>bA</sup>	51,9 ± 4,2 <sup>aA</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	34,3 ± 2,4 <sup>bA</sup>	55,9 ± 3,3 <sup>aA</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

Tabela 5: Médias e erros padrão dos percentuais de espermatozoides criopreservados de equinos com membrana acrossomal íntegra de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	61,0 ± 1,7 <sup>aA</sup>	23,1 ± 2,0 <sup>bA</sup>
Dimetilformamida	67,8 ± 1,5 <sup>aA</sup>	18,9 ± 2,7 <sup>bA</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	65,8 ± 1,4 <sup>aA</sup>	25,4 ± 3,7 <sup>bA</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	65,2 ± 1,8 <sup>aA</sup>	22,1 ± 2,0 <sup>bA</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

A presença de menor população espermática com membranas plasmática e acrossomal íntegras verificada nas amostras de sêmen do tratamento contendo apenas o glicerol (tabela 3), provavelmente se deve ao fato do glicerol penetrar mais lentamente na célula espermática possibilitando maior estresse osmótico aos espermatozoides. Isso se deve ao fato de, ao ser colocado em uma solução hiperosmótica contendo o glicerol, o espermatozoide primeiramente desidrata devido a retirada de água para o meio extracelular e depois aumenta de volume a medida que o glicerol penetra lentamente permitindo concomitantemente o influxo de água e maior estresse osmótico (GAO et al., 1995).

Além disso, a concentração de 5% de glicerol pode ter causado toxicidade aos espermatozoides, conferindo a eles, menor proteção durante o processo de criopreservação e descongelamento (FAHY, 1986; HAMMERSTEDT et al., 1992; FAHY, 2010). Um dos efeitos tóxicos do glicerol sobre os espermatozoides são os danos causados a membrana plasmática (MACÍAS-GARCÍA et al., 2012).

A SLC pode ter retirado o efeito crioprotetor conferido pela dimetilformamida e metilformamida (presente no BotuCrio<sup>®</sup>), visto que, nos diluentes contendo maior concentração de glicerol, não houve diferença antes e após a centrifugação (Tabela 3). Devido ao fato de terem menor peso molecular comparado ao glicerol, as amidas, além de penetrarem mais facilmente na célula, possivelmente são retiradas da célula com mais

facilidade, processo que pode ter ocorrido devido à centrifugação do sêmen com o coloide de sílica (SQUIRES et al., 2004).

A recuperação de maior população espermática com membrana plasmática íntegra após a centrifugação em camada única observada na tabela 4, já foi realizada em sêmen fresco e congelado de garanhões (JOHANNISSON et al., 2009; MACIAS GARCIA et al., 2009; MORRELL et al., 2014). Resultados semelhantes também foram obtidos em sêmen congelado de cães (DORADO et al., 2013), veado (ANEL-LÓPES et al., 2015) e caprinos (JIMÉNEZ-RABADÁN et al., 2012).

Houve redução na concentração de espermatozoides com acrossoma íntegro após a centrifugação com a solução coloidal (tabela 5). A membrana acrossomal pode ser lesionada durante o manuseio e processamento do sêmen (POMMER et al., 2002b; BOSARD et al., 2005). Bucci et al. (2013) ao analisarem sêmen congelado de suíno observaram que a SLC com Androcoll-E™ não melhorou a porcentagem de espermatozoides com o acrossoma íntegro.

### **5.3. Avaliação da desorganização da bicamada lipídica**

As mudanças de fluidez da membrana detectadas pela M540 antecedem a detecção de influxo de cálcio detectado pelo CTC (antibiótico fluorescente clortetraciclina), fazendo com que a M540 seja um método melhor para avaliar os eventos primários da capacitação (RATHI et al., 2001). A M540 detecta as desordens fosfolipídicas que ocorrem no início da capacitação pelo aumento de bicarbonato intracelular (GADELLA et al., 2000; RATHI et al., 2001).

No presente estudo, a organização da membrana espermática (tabela 7) foi avaliada a partir dos espermatozoides com membrana íntegra (tabela 6), a fim de avaliar apenas a atividade metabólica dos espermatozoides viáveis.

Na avaliação do sêmen pós-descongelamento, o tratamento no qual se empregou unicamente o glicerol como crioprotetor, se observou menor porcentagem de espermatozoides com membrana organizada comparada com os demais tratamentos, e o tratamento contendo BotuCrio®, maior porcentagem de espermatozoides com membrana organizada (tabela 7).

Após o uso da solução coloidal, houve aumento na quantidade de espermatozoides com membrana organizada (exceto no tratamento contendo BotuCrio<sup>®</sup>), sugerindo que esta é capaz de selecionar espermatozoides menos susceptíveis ao processo de capacitação prematura e retirar o efeito do crioprotetor sobre a célula espermática, uma vez que não foi verificada diferença entre os crioprotetores.

Tabela 6: Médias e erros padrão dos percentuais de espermatozoides criopreservados de equinos com membrana íntegra de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluyente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	19,1 ± 1,9 <sup>bB</sup>	45,4 ± 3,0 <sup>aB</sup>
Dimetilformamida	32,7 ± 2,7 <sup>bA</sup>	54,7 ± 4,6 <sup>aA</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	32,3 ± 1,9 <sup>bA</sup>	54,7 ± 4,3 <sup>aA</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	32,3 ± 1,9 <sup>bA</sup>	55,9 ± 3,5 <sup>aA</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

Tabela 7: Médias e erros padrão dos percentuais de espermatozoides criopreservados de equinos com membrana organizada de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluyente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	23,4 ± 3,2 <sup>bC</sup>	60,0 ± 3,8 <sup>aA</sup>
Dimetilformamida	39,0 ± 5,6 <sup>aB</sup>	49,5 ± 4,9 <sup>aA</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	47,7 ± 6,1 <sup>aB</sup>	54,6 ± 4,8 <sup>aA</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	70,5 ± 5,5 <sup>aA</sup>	52,9 ± 4,9 <sup>bA</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

A capacitação espermática desestabiliza a membrana plasmática, que quando ocorre precocemente, leva à ruptura acrossomal e/ou morte celular (CORMIER et al., 1997; JANUSKAUSKAS et al., 2000). No presente estudo, a presença de uma menor população com membrana plasmática e acrossomal íntegras (tabela 3) associada à presença de menor população espermática com membrana organizada (tabela 7) indicam que o glicerol tenha causado capacitação espermática e reação acrossomal precoces. Watson (1995) sugeriu que o processo de criopreservação torna as membranas espermáticas

mais reativas após o descongelamento, indicando que os espermatozoides capacitam mais rapidamente. Desde modo, a detecção dos estágios iniciais da capacitação pode ser benéfica para detectar uma população espermática com sobrevivência reduzida e consequente capacidade fertilizante deficiente, especialmente no pós-descongelamento (NIZANSKI et al., 2012).

A diminuição da população espermática com membrana organizada após a centrifugação em camada única, encontrada no tratamento BotuCrio® (tabela 7) pode ser devido ao fato de o coloide de sílica ser mais eficiente apenas na filtragem de amostras espermáticas que contêm maior quantidade de injúrias, indicando possivelmente sua maior eficiência em animais classificados por Alvarenga et al. (2005), como “maus congeladores” que nos “bons congeladores”.

#### **5.4. Avaliação do potencial mitocondrial**

A maioria dos trabalhos envolvendo o uso da SLC indica que esta melhora determinadas características espermáticas, porém menor atenção é dada quando se busca um melhor potencial mitocondrial (PEÑA et al., 2015).

A energia para o movimento flagelar provém da mitocôndria localizada na peça intermediária. Sendo assim, mudanças na função mitocondrial podem ser refletidas na motilidade espermática (ERICSSON et al., 1993). O JC-1 permite uma estimativa da função mitocondrial mais rigorosa em comparação com outros corantes específicos para mitocôndria (GARNER et al., 1997).

Ao comparar o potencial mitocondrial no pós-descongelamento e após o uso da SLC, observou-se redução na população espermática com alto potencial mitocondrial (APM) pós-centrifugação para todos os tratamentos (tabela 8).

Tabela 8: Médias e erros padrão dos percentuais de espermatozoides criopreservados de equinos com alto potencial mitocondrial de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluyente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	10,4 ± 2,1 <sup>aA</sup>	1,9 ± 0,3 <sup>bA</sup>
Dimetilformamida	14,2 ± 1,7 <sup>aA</sup>	2,0 ± 0,4 <sup>bA</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	14,6 ± 2,6 <sup>aA</sup>	4,6 ± 2,4 <sup>bA</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	17,8 ± 1,9 <sup>aA</sup>	2,0 ± 0,4 <sup>bA</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Duncan.

Macías-Garcia e colaboradores (2012b), trabalhando com sêmen de garanhões, não verificaram diferença em relação ao potencial mitocondrial dos espermatozoides em ejaculados frescos antes e após o uso da SLC. Corroborando, Gamboa et al. (2016) ao analisarem sêmen de garanhões Lusitano (de fertilidade provada) e Sorraia (de fertilidade desconhecida), também não verificaram diferença na população espermática com APM após o uso da SLC comparado com os valores obtidos nas análises do sêmen fresco. Entretanto, Macías-García et al. (2009) após a centrifugação do sêmen congelado de garanhões com o Androcoll-E<sup>™</sup> obtiveram população com APB (42,2%) maior em relação ao controle (8,9%).

Uma baixa população com APM pós-centrifugação pode ser devido ao período de incubação com a sonda JC-1 que foi de 40 minutos. O mesmo tempo foi utilizado por Macías-Garcia et al. (2012b) e Morrell et al., 2016 não encontrando diferença no potencial mitocondrial antes e depois da SLC. Gamboa et al. (2016), utilizou o tempo de incubação com a sonda JC-1 de 20 minutos, também não encontrando aumento na população espermática com APM pós SLC. Isso pode ser indicativo de que um período menor de incubação deve ser testado para avaliar o potencial mitocondrial dos espermatozoides de garanhão.

No presente estudo, apesar de ter sido verificado menor potencial mitocondrial após o uso da SLC, os valores médios para o potencial mitocondrial se apresentaram baixos antes da centrifugação. Isso pode ser devido ao fato de que as mitocôndrias espermáticas são as organelas mais sensíveis ao choque térmico (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008).

Além disso, a pequena porcentagem de espermatozoides com APM também pode ser explicada devido a alta sensibilidade das mitocôndrias ao estresse osmótico (MACIAS GARCIA et al., 2011; GONZALEZ-FERNANDES et al., 2012) que pode ter ocorrido pelo uso de diferentes crioprotetores. Contudo, isso pode não interferir na capacidade fecundante desses espermatozoides, uma vez que, a reduzida viabilidade do sêmen descongelado de garanhões comparada ao sêmen fresco, exige que a inseminação seja realizada próxima à ovulação, mais próxima ao local de fecundação, exigindo manejo mais cauteloso das éguas a serem cobertas (PEÑA et al., 2015).

### 5.5. Avaliação da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular

Espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas no processo de capacitação espermática assim como no processo apoptótico que culmina na morte dos espermatozoides (AITKEN et al., 2015). Dentre as ROS, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem importante papel nessa ação (RIVLIN et al., 2004; O'FLAHERTY et al., 2006). Tanto os espermatozoides de garanhões quanto o do homem são bastante vulneráveis ao estresse oxidativo devido a alta presença de ácidos graxos poli-insaturados no seu plasmalema (AITKEN et al., 2007; MACÍAS GARCÍA et al., 2011b).

No presente estudo, ao analisar a produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) juntamente com a integridade de membrana, observou-se que a SLC retêm mais espermatozoides com menor produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e com membrana íntegra (Tabelas 9 a 13).

Tabela 9: Médias e erros padrão dos percentuais de espermatozoides criopreservados de equinos com baixa produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) intracelular e membrana íntegra de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluyente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	6,1 ± 0,7 <sup>bA</sup>	24,6 ± 2,5 <sup>aA</sup>
Dimetilformamida	7,3 ± 1,2 <sup>bA</sup>	25,4 ± 4,2 <sup>aA</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	8,2 ± 1,0 <sup>bA</sup>	29,4 ± 4,8 <sup>aA</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	6,7 ± 0,8 <sup>bA</sup>	26,5 ± 3,4 <sup>aA</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05) pelo teste de Duncan.

Tabela 10: Médias e erros padrão dos percentuais de espermatozoides equinos criopreservados com baixa produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) intracelular de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluyente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	08,0 ± 0,6 <sup>bA</sup>	33,8 ± 2,3 <sup>aA</sup>
Dimetilformamida	09,4 ± 1,1 <sup>bA</sup>	32,4 ± 4,0 <sup>aA</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	10,5 ± 1,0 <sup>bA</sup>	37,2 ± 4,6 <sup>aA</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	08,8 ± 0,8 <sup>bA</sup>	33,8 ± 3,3 <sup>aA</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Duncan.

Tabela 11: Médias e erros padrão dos percentuais de espermatozoides equinos criopreservados com membrana íntegra de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluyente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	17,9 ± 1,8 <sup>bB</sup>	35,7 ± 2,5 <sup>aB</sup>
Dimetilformamida	31,5 ± 2,9 <sup>bA</sup>	46,5 ± 4,8 <sup>aA</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	30,6 ± 1,8 <sup>bA</sup>	46,3 ± 5,0 <sup>aA</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	29,5 ± 2,4 <sup>bA</sup>	42,0 ± 3,4 <sup>aA</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Duncan.

Tabela 12: Médias e erros padrão da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avaliada pela intensidade de brilho do DCFDA, da população de espermatozoides total criopreservados de equino de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluyente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	5840,4 ± 464,9 <sup>aA</sup>	3467,0 ± 352,8 <sup>bA</sup>
Dimetilformamida	5120,0 ± 382,0 <sup>aA</sup>	2965,5 ± 328,8 <sup>bA</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	5370,4 ± 427,2 <sup>aA</sup>	3491,0 ± 380,5 <sup>bA</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	5232,6 ± 447,2 <sup>aA</sup>	3157,9 ± 331,6 <sup>bA</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Duncan.

Tabela 13: Médias e erros padrão da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avaliada pela intensidade de brilho do DCFDA, da população viável de espermatozoides criopreservados de equino de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluyente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	3577,6 ±268,2 <sup>aA</sup>	1148,6 ±199,5 <sup>bA</sup>
Dimetilformamida	3757,6 ±216,4 <sup>aA</sup>	1377,5±231,7 <sup>bA</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	3961,9 ±338,1 <sup>aA</sup>	1420,8 ±211,1 <sup>bA</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	4092,3 ±368,4 <sup>aA</sup>	1266,7 ±237,2 <sup>bA</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Duncan.

Tabela 14: Médias e erros padrão das médias dos percentuais de espermatozoides criopreservados de equinos com alta produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) intracelular e membrana lesionada de acordo com o diluente e centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluyente	SLC	
	Sem	Com
Glicerol	80,2 ± 1,9 <sup>aA</sup>	55,1 ± 2,1 <sup>bA</sup>
Dimetilformamida	66,4 ± 2,9 <sup>aB</sup>	46,5 ± 4,5 <sup>bB</sup>
Glicerol + Dimetilformamida	67,1 ± 1,7 <sup>aB</sup>	45,9 ± 4,9 <sup>bB</sup>
BotuCrio <sup>®</sup>	68,4 ± 2,3 <sup>aB</sup>	50,6 ± 3,2 <sup>bB</sup>

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Duncan.

O processo de criopreservação espermática resulta em alta produção de ROS (BALL et al., 2001; KANKOFER et al., 2005; BALL, 2008) o que pode explicar a alta taxa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verificada nas amostras de sêmen pós descongelamento.

A presença de maior população espermática com menor produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> após SLC no presente estudo, também foi verificada por Morrell et al. (2013) ao avaliarem sêmen de garanhões no início e no final da estação de monta antes e após a SLC. Segundo os autores, essa menor produção de peróxido de hidrogênio pode contribuir para maior sobrevivência dos espermatozoides. Resultados semelhantes foram obtidos por Morrell et al. (2016) ao avaliarem sêmen resfriado de garanhões, indicando que a menor produção de peróxido de hidrogênio contribui para maior sobrevivência e fertilidade dos espermatozoides.

Como as ROS são subprodutos do metabolismo, é de se esperar que espermatozoides com alta metabolização produzam mais ROS do que àqueles com taxas metabólicas menores (AURICH, 2005), o que é comprovado no presente estudo, ao associar os dados da tabela 7 ao da tabela 13, onde após a SLC, foi obtida maior percentagem de espermatozoides com membrana organizada e menor metabolismo e com menor produção de  $H_2O_2$ .

Como o sêmen refrigerado de garanhões selecionado após a SLC ainda tem alta fertilidade após 96 horas de estocagem (LINDAHL et al., 2012) é sugerido que a SLC tenha a capacidade de remover grande quantidade de espermatozoides produtores de ROS ou selecionar espermatozoides que são mais resistentes aos efeitos deletérios causados pelas espécies reativas de oxigênio (MORRELL et al., 2013). Além disso, a SLC remove espermatozoides anormais e imaturos, diminuindo as fontes de ROS (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2011).

Van Wiene et al. (2011) ao analisarem sêmen suíno observaram maior produção de ROS após SLC, sendo atribuído ao fato desse processo também ter selecionado maior quantidade de espermatozoides mortos, além de ter removido o plasma seminal que contém certa quantidade de antioxidantes.

ROS produzido excessivamente causa danos especialmente na membrana (GOMEZ et al., 2012). Na tabela 14, o fato do glicerol ter a maior percentagem de espermatozoides com alta produção de  $H_2O_2$ , pode explicar a maior quantidade de células com membrana lesionada em relação aos outros tratamentos.

Na espécie equina existe uma relação entre a exposição do sêmen a altas concentrações de ROS e danos causados ao DNA. Ao causar danos diretamente ao DNA, as ROS comprometem a contribuição genômica paternal ao embrião (TREMELLEN, 2008). Danos ao DNA causados por estresse oxidativo podem causar anormalidades na prole, incluindo câncer e acondroplasia (AITKEN et al., 2001; 2003). Além disso, ROS são importantes na mediação da apoptose, a qual resulta em alta frequência de ruptura ou fragmentação de DNA (SAID et al., 2004).

No presente estudo não foi feita análise de danos causados ao DNA, porém com os resultados obtidos com a produção de  $H_2O_2$  (tabelas 9, 10, 12 e

13), pode-se inferir que os espermatozoides selecionados pela SLC também apresentam menor lesão de DNA.

### 5.6. População espermática recuperada pós SLC (rendimento espermático)

O rendimento espermático pós-centrifugação (tabela 15) mostrou que a SLC recupera em média  $6,95 \pm 0,91$  % da população espermática, não sendo observada diferença entre os valores médios registrados nos tratamentos.

Tabela 15: Médias e erros padrão dos percentuais do rendimento\* de espermatozoides criopreservados de equinos de acordo com o diluente após a centrifugação em camada única (SLC – *Single Layer Centrifugation*)

Diluentes	Rendimento
Glicerol	$5,7 \pm 1,0$
Dimetilformamida	$7,8 \pm 1,0$
Glicerol + Dimetilformamida	$7,8 \pm 1,0$
BotuCrio®	$6,5 \pm 1,9$
Geral	$6,9 \pm 0,9$

\*( $P > 0,05$ ) pelo teste de Kruskal-Wallis.

Morrell et al. (2008) ao analisar sêmen fresco de garanhão, no qual os ejaculados foram submetidos à centrifugação por gradiente denso e por camada única, não verificaram diferença entre as centrifugações, encontrando rendimento espermático entre 19 a 42%. Morrell et al. (2009c) usando duas formas de centrifugação (1,5 mL de sêmen diluído sobre 4 mL de Androcoll-E™; 7,5 mL de sêmen diluído sobre 20 mL de Androcoll-E™) verificaram rendimento espermático de  $32 \pm 22,3$  e  $8,9 \pm 8,9$  %, respectivamente. Morrell et al. (2010) usando também duas formas de centrifugação (4,5 mL de sêmen fresco diluído sobre 4 mL de Androcoll-E™ e 15 mL de sêmen fresco diluído sobre 15 mL de Androcoll-E-Large™) obteve rendimento espermático de  $57 \pm 19$  e  $33 \pm 18$  %, respectivamente.

Morrell et al. (2014) ao analisar sêmen resfriado de garanhão obteve rendimento espermático de 22-87 % (média de 57 %) após SLC, e, Morrell et al. (2011) obtiveram rendimento espermático de 21-69 %, média de 50%. Macías-García et al. (2009) ao analisar sêmen congelado de garanhões obteve um rendimento espermático de 20-40 % após a SLC.

Apesar de grande variação encontrada entre os diversos autores, o fato de ter sido utilizado nesse estudo uma nova solução coloidal (Equicoll-Small™), pode explicar o baixo rendimento espermático, indicando que novas metodologias devem ser testadas para melhora dos resultados.

### 5.7. Comparação do sêmen centrifugado com o sobrenadante

Foi feito no presente estudo a análise do sobrenadante para verificar a eficácia do novo coloide de sílica destinado à filtração de sêmen criopreservado de garanhões. Na tabela 16, verifica-se que o sobrenadante reteve a maioria dos espermatozoides com algum tipo de lesão ou desordem metabólica, indicando que o Equicoll-Small™ é eficaz na seleção de espermatozoides viáveis criopreservados.

Tabela 16: Médias e erros padrão dos percentuais dos espermatozoides criopreservados de equinos no sobrenadante e no centrifugado após centrifugação em camada única (SLC - *Single Layer Centrifugation*)

Parâmetros	Sobrenadante	Centrifugado
MP e MA íntegros	05,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	21,4 ± 1,3 <sup>a</sup>
MP e MA lesionados	70,1 ± 1,3 <sup>a</sup>	47,7 ± 2,0 <sup>b</sup>
MA íntegra	05,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	22,3 ± 1,3 <sup>a</sup>
MA lesionada	94,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	77,7 ± 1,3 <sup>b</sup>
MP íntegra	28,8 ± 1,3 <sup>b</sup>	51,4 ± 2,0 <sup>a</sup>
MP lesionada	71,2 ± 1,3 <sup>a</sup>	48,6 ± 2,0 <sup>b</sup>
MP desorganizada	70,2 ± 2,3 <sup>a</sup>	45,8 ± 2,3 <sup>b</sup>
MP organizada	29,8 ± 2,3 <sup>b</sup>	54,2 ± 2,3 <sup>a</sup>
APM	01,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	02,6 ± 0,6 <sup>a</sup>
BP de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e MP lesionada	0,4 ± 0,04 <sup>b</sup>	07,8 ± 0,5 <sup>a</sup>
BP de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e MP íntegra	04,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	26,4 ± 1,9 <sup>a</sup>
AP de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e MP lesionada	76,2 ± 1,1 <sup>a</sup>	49,7 ± 1,9 <sup>b</sup>
AP de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e MP íntegra	19,4 ± 1,0 <sup>a</sup>	16,1 ± 1,2 <sup>a</sup>
BP de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	04,4 ± 0,5 <sup>b</sup>	34,2 ± 1,8 <sup>a</sup>
AP de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	95,6 ± 0,5 <sup>a</sup>	65,8 ± 1,8 <sup>b</sup>

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P<0,05) pelo teste t pareado; MP – membrana plasmática; MA – membrana acrossomal; APM – alto potencial mitocondrial; BP – baixa produção; AP – alta produção

## 6. CONCLUSÃO

Os crioprotetores dimetilformamida (DMFA) e glicerol (DG) em associação com o glicerol (DG) apresentam melhores condições para manutenção da viabilidade espermática *in vitro* em comparação com glicerol no pós-descongelamento, e ambos podem ser utilizados como alternativa de crioprotetores em diluentes para criopreservação de sêmen equino.

A centrifugação em camada única (SLC) com o Equicoll-Small™ mostra-se eficaz na obtenção de população espermática viável, principalmente quando utilizada em doses espermáticas com mais crioinjúrias, porém seu rendimento ainda mostra-se um fator limitante para que a técnica se torne rotina.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress. DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**. v. 122, p. 497-506, 2001.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A.; SAWYER, D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the etiology of male infertility and genetic diseases. **Reproductive BioMedicine Online**. v. 7, p. 65-70, 2003.

AITKEN, R. J.; WINGATE, J. K.; DE LULIIS, G. N.; MCLAUGHLIN, E. A. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**. v. 13, p. 203-211, 2007.

AITKEN, R. J.; WHITING, S. DE LULIIS, G. N.; McCLYMONT, S.; MITCHELL, L. A. Electrophilic aldehydes generated by sperm metabolism activate mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis by targeting succinate dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 287, p. 33048–33060, 2012.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A.; NIXON, B. Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? **Asian Journal of Andrology**. v.17, p. 633-639, 2015.

ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MOREIRA, R. M.; CESARINO, M. M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**. v. 32, p. 541-545. 2000.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**. v. 89, p. 105-113. 2005.

ÁLVAREZ, C.; GIL, L.; GONZÁLEZ, N.; OLACIREGUI, M.; LUÑO, V. Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® extender. **Cryobiology**. v. 69, p. 144-148, 2014.

ANEL-LÓPEZ, L. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.; SOLER, A. J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R. GARDE, J. J.; MORRELL, J. M. Use of Androcoll-S after thawing improves the quality of electroejaculated and epididymal sperm samples from red deer. **Animal Reproduction Science**. v. 158, p. 68-74, 2015.

ANDRABI, S. M. H. Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa. Mini review. **International Journal of Agriculture and Biology**. v. 9, p. 367-369, 2007.

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

ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: **SYMPOSIA OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY**, Cambridge: Biologists Ltda, p 395-406, 1987.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v. 89, p. 65–75, 2005.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**. v. 21, p. 1-7, 2000.

BALL, B. A.; VO, A. T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**. v. 62, p. 508-515, 2001.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**. v. 107, p. 257-267, 2008.

BEDFORD, S. J.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**. v. 43, p. 955-957, 1995.

BOSARD, T.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S.; BLANCHARD, T.; THOMPSON, J.; VARNER, D. Evaluation and diagnosis of acrosome function/dysfunction in the stallion. **Animal Reproduction Science**. v. 89, p. 215-217, 2005.

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

BUCCI, D.; SPINACI, M.; MORRELL, J. M.; VALLORANI, C.; TAMANINI, C.; GUIDETTI, R.; GALEATI, G. Effects of single layer centrifugation with Androcoll-P on boar sperm. **Animal Reproduction Science**. v. 138, p. 276-281, 2013.

CARMO, M. T.; PAPA, F. O.; MEDEIROS, A. S. L.; ARAUJO, G. H. M. ALVARENGA, M. A. Improvement of stallion semen post-thaw motility with the association dimethylformamide and methylformamide as cryoprotectors. **Animal Reproduction Science**. v. 89, p. 286-288, 2005.

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

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 3ª ed. Belo Horizonte, p.104, 2013.

CHAVERIO.; MACHADO, A. L.; FRIJTERS, A.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Improvement of parameters of freezing protocol for Bull sperm using two osmotic supports. **Theriogenology**. v. 65, p. 1875-1890, 2006.

CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; LOVE, L. B.; VARNER, D.; BRINSKO, S. P.; HINRICHS, K. Developmental competence on vivo and in vitro of in vitro matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed sperm. **Reproduction**. v. 123, p. 455-465, 2002.

CLULOW, J. R.; MANSFIELD, L. J.; MORRIS, L. H. A.; EVANS, J.; MAXWELL, W. M. C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v. 108, p. 298-308, 2008.

COELHO, L. B. N.; DA-SILVA, E. R. Flutuação populacional de *Agallia incongrua* Oman, 1938 (hemiptera: cicadellidae) em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Biotaneotropica**, v. 3, n. 2. 2003.

COOTER, P. Z.; GOOLSBY, H. A.; PRIEN, S. D. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 40, p. 98-99, 2005

CORMIER, N.; SIRARD, M. A.; BAILEY, J. L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**. v. 18, p. 461-468. 1997.

COTORELLO, A. C. P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen equino (revisão de literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 25, p. 14-25. 2002.

CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**. v.15, p.213–226. 1986.

DEMICK, D. L.; VOSS, J. L.; PICKETT, B. W. Effects of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal number on equine fertility. **Journal of Animal Science**. v. 43, p. 633-637, 1976.

DEVIRREDY, R. V.; SWANLUND, D. J.; OLIN, T.; VINCENT, W.; TROEDSSON, M. H. T.; BISCHOF, J. C.; ROBERTS, K. P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. **Biology of Reproduction**. v. 66, p. 222-231, 2002.

DOEBBLER, G. F. Cryoprotective compounds- review and discussion of structure and function. **Cryobiology**, v. 4, p. 2-1. 1966.

DONNELLY, E. T.; O'CONNEL, M.; McCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction**. v. 15, p. 1552-1561, 2000.

DORADO, J.; GÁLVEZ, M. J.; MORRELL, J. M.; ALCARÁZ, L.; HIDALGO, M. Use of single-layer centrifugation with Androcoll-C to enhance sperm quality in frozen-thawed dog semen. **Theriogenology**. v.80, p. 955–962, 2013.

EASTON, T.G.; VALINSKY, J.E.; REICH, E. Merocyanine 540 as a Fluorescent Probe of Membranes: Staining of Electrically Excitable Cells. **Cell**. v.13, p.475-486. 1978.

ERICSSON, S. A.; GAMER, D. L.; THOMAS, C. A.; DOWNING, T. W.; MARSHALL, C. E. Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoa function, classical semen quality parameters and the fertility of

frozen-thawed bovine spermatozoa. **Theriogenology**. v. 39, p. 1009- 1024, 1993.

FAGUNDES, B.; TILBUG, M.F.Van; SOUZA, G.V. et al. Effect of addition of concentrated proteins and seminal plasma low molecular weight proteins in freezing and thawing of equine semen. **Acta Biomedica Brasiliensia**. v.2, p.1-6, 2011.

FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**. v. 23, p, 1-13, 1986.

FAHY, G; LEVY, D. I.; ALI, S. E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. **Cryobiology**. v. 24, p. 196-213, 1897.

FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**. v. 60, p. S45-S53, 2010.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; RUAS, J. R. M.; BORGES, A. M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, p. 599-607, 2005.

GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. P. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the plasma membrane. **Development**. v. 127, p. 2407-2420, 2000.

GAMBOA, S.; QUARESMA, A.; CASTRO, F.; BRAVO, P.; REBORDÃO, M. R.; OOM, M. M.; ROCHA, A. In vivo fertilizing ability of stallion spermatozoa processed by single layer centrifugation with Androcoll-E™. **Saudi Journal of Biological Sciences** (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.030>

GAO, D.Y.; LIU, J.; LIU, C.; MCGANN, L.E.; WATSON, P.F.; KLEINHAUS, F.W. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reproduction**. v. 10, p.1109–1122, 1995.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biological Reproduction**. v. 57, p. 1401– 1406, 1997.

GILMORE, J. A.; MCGANN, L. E.; LIU, J.; GAO, D. Y.; PETER, A. T.; KLEINHANS, F. W.; CRITSER, J. K. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biological Reproduction**. v. 53, p. 985-995. 1995.

GILMORE, J. A.; LIV, J.; GAO, D. Y.; CRITSER, J. K. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 12, p. 112-118. 1997.

GLAZAR, A. I.; MULLEN, S. F.; LIU, J.; BENSON, J. D.; CRITSER, J. K.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**. v. 59, p. 201-206. 2009.

GOMES, G. M.; JACOB, J. C. F.; MEDEIROS, A. S.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**. v. 58, p. 277-279. 2002.

GOMEZ, P. N.; ALVAREZ, J. G.; RISOPATRON, J.; ROMERO, F.; SANCHEZ, R. Effect of tubal explants and their secretions on bovine spermatozoa: modulation of ROS production and DNA damage. **Reproduction, Fertility and Developmet**. v. 24, p. 871-876, 2012.

GONZALEZ-FERNANDEZ, L. MORRELL, J. M.; PEÑA, F. J.; MACIAS-GARCIA, B. Osmotic shock induces structural damage on equine spermatozoa plasmalemma and mitochondria. **Theriogenology**. v. 78, p. 415-422, 2012.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-38, 1992.

HOLT, W. V; PENFOLD, L. M. Fundamental and practical aspects of semen cryopreservation. In: **Animal Andrology: Theories and Applications**. p.76-100, 2014.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics PT and response to calcium ionophore in relation to the fertility of Swedish dairy AI bulls. **Theriogenology**. v. 53, p. 859-875. 2000.

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

JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; MORRELL, J. M.; JOHANNISSON, A.; RAMÓN, M.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A. ÁLVARO-GARCÍA, P. J.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. Single layer centrifugation (SLC) improves sperm quality of cryopreserved Blanca-Celtibérica Buck semen. **Animal Reproduction Science**. v. 136, p.47-54, 2012.

JOHANNISSON, A.; MORRELL, J. M.; THOREN, J. JONSSON, M.; DALIN, A. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloidal centrifugation with Androcoll-E™ prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. **Animal Reproduction Science**. v. 116, p. 119-128, 2009.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity

in stallion semen during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**. v.63, p. 1354-1365, 2005.

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

KOPPERS, A. J.; MITCHELL, L. A.; WANG, P.; LIN, M.; AITKEN, R. J. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. **Biochemical Journal**. v. 436, p. 687–698, 2011.

LANGNER, M.; HUI, S.W. Merocyanine interaction with phosphatidyl choline bilayers. **Biochimicaet Biophysica Acta**. v.1149, p.175–179. 1993.

LEIBO, S. P.; BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: GAGNON, C. (Ed). **The Male Gamet: from basic science to clinical application**. Vienna: Cache River Press, p. 501-516, 1999.

LEMMA, A. Effect of Cryopreservation on Sperm Quality and Fertility. In: MANAFI, M. (Ed.) **Artificial Insemination in Farm Animals**, InTech, p. 191-216. 2011.

LINDAHL, J.; DALIN, A. M.; STUHTMANN, G.; MORRELL, J. M. Stallion spermatozoa selected by single layer centrifugation are capable of fertilization after storage for up to 96 h at 6°C prior to artificial insemination. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.54, p. 40-44, 2012.

LOOMIS P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**. v.105, p. 119-128, 2008.

LORENZONI, S. L. G. **Criopreservação de sêmen equino envasado em criotubo**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.

MACIAS GARCIA, B.; MORRELL, J. M.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZALEZ FERNANDEZ, L.; TAPIA, J. A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; PENA, F. J. Centrifugation on a single layer of colloid selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed stallion semen. **Animal Reproduction Science**. v. 114, p. 193-202, 2009.

MACIAS, G. B.; MIRO, M. A.; GONZALEZ, F. L.; ORTEGA, F. C.; MORILLO, R. A.; GALLARDO BOLANOS, J. M.; BALAO DA SILVA, C. M.; RODRIGUEZ, M. H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic induced stress: role of c-Jun 60 Nterminal kinase (JNKs) pathway. **Journal of Andrology**. v. 33, p. 105-113. 2011.

MACÍAS GARCIA, B.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MORILLO RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H. Membrane Lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 46, p. 141-148, 2011b.

MACIAS GARCIA, B.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; APARICIO, I. M.; MIRO-MORAN, A.; MORILLO RODRIGUEZ, A.; GALLARDO BOLANOS, J. M.; GONZALEZ FERNANDEZ, L.; BALAO DA SILVA, C. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PENA, F. J. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. **Theriogenology**. v.77, p.1280-1289. 2012a.

MACÍAS-GARCÍA, B.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; MORRELL, J. M. Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. **Animal Reproduction Science**. v. 132, p. 74-82, 2012b.

MATYUS, L.; SZABO, J.R.G.; RESLI, I.; GASPAR JR, R.; DAMJANOVICH, S. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. **Acta Biochimicaet Biophysica Acta**. v.19, p.209-214, 1984.

MEDEIROS, A. S. L.; GOMES, G.; CARMO, M. T.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**. v. 58, p. 273–276. 2002.

MORRELL, J. M. Update on semen technologies for animal breeding. **Reproduction in Domestic Animals**. v.40, p. 1-5, 2006.

MORRELL, J. M.; DALIN, A. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Prolongation of stallion sperm survival by centrifugation through coated silica colloids: A preliminary study. **Animal Reproduction**. v. 5, p. 121-126, 2008.

MORRELL, J. M.; JOHANNISSON, A.; STRUTZ, H.; DALIN, A. M.; RODRIGUEZ- MARTINEZ, H. Colloidal centrifugation of stallion semen: changes in sperm motility, velocity and chromatin integrity during storage. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.29, p. 24-32, 2009a.

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

MORRELL, J. M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A. H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Single Layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. **Theriogenology**. v. 72, p. 879-884, 2009c.

MORRELL, J. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; JOHANNISSON, A. Single Layer Centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size. **Equine Veterinary Journal**. v. 42, p. 579-585, 2010.

MORRELL, J. M.; MARI, G.; KUTYVOLGYI, G.; MEURLING, S.; IACONO, E.; MISLEI, B. Spermatozoa from stallion ejaculates processed by single layer centrifugation with Androcoll-E are capable of fertilization after artificial insemination. **Reproduction of Domestic Animals**. v.46, p. 642-645, 2011.

MORRELL, J. M.; WINBLAD, C.; GEORGAKAS, A.; STUHTMANN, G.; HUMBLLOT, P.; JOHANNISSON, A. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. **Animal Reproduction Science**. v.140, p. 62-69, 2013.

MORRELL, J. M.; STUHTMANN, G.; MEURLING, S.; LUNDRENG, A.; WINBLAD, C.; MACIAS GARCIA, B.; JOHANNISSON, A. Sperm yield after single layer centrifugation with Androcoll-E is related to the potential fertility of the original ejaculate. **Theriogenology**. v. 81, p. 1005-1011, 2014.

MORRELL, J. M.; LAGERQVIST, A.; HUMBLLOT, P.; JOHANNISSON, A. Effect of a Single Layer Centrifugation on reactive oxygen species and sperm mitochondrial membrane potential in cooled stallion semen. **Reproduction, Fertility and Development**. <http://dx.doi.org/10.1071/RD15440>

MORRIS, G. J.; ACTON, E.; MURRAY, B. J.; FONSECA, F. Freezing injury: the special case of the sperm cell. **Cryobiology**. v. 64, p.71-80, 2012.

MORTIMER, D. Sperm preparation methods. **Journal of Andrology**. v.21, p.375-366, 2000.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: Meryman H. T (Ed.). **Cryobiology**. New York: Academic Press, p. 179-210, 1966.

NIZANSKI, W. PARTYKA, A.; RIJSSELAERE, T. Use of fluorescent staining nad flow cytometry for canine semen assessment. **Reprodution in Domestic Animals**. v. 47, p. 215-221, 2012.

O'FLAHERTY, C.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology & Medicine**. v.41, p. 528-540, 2006.

OLACIREGUI, M.; GIL, L.; MONTÓN, A.; LUÑO, V.; JEREZ, R. A.; MARTÍ, J. I. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. **Cryobiology**. v. 68, p. 91-95, 2014.

OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; CELEGHINI, E.C.C.; SANTOS, R.M.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.G.; OLIVEIRA, C.S.; LIMA, V.F.M.H. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelorecows. **Livestock Science**. v.146, p.38–46. 2012.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; SOTILLO-GALAN, Y.; VARELA-FERNANDEZ, E.; GALLARDOBOLANOS, J. M.; MURIEL, A.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Detection of “apoptosis-like” changes during the cryopreservation process in equine sperm. **Journal of Andrology**. v. 29, p. 213-221, 2008.

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore

reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, p. 458–465. 2010.

ORTEGA FERRUSOLA, C.; JOHANNISSON, A.; PEÑA, F. J.; TAPIA, J. A.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; DALIN, A. M.; MORRELL, J. M. Effect of Different Extenders and Seminal Plasma on the Susceptibility of Equine Spermatozoa to Lipid Peroxidation After Single-Layer Centrifugation, Through Androcoll-E. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 31, p. 411-416, 2011.

PACE, M. M.; SULLIVAN, J. J. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility (Supplement)**. v. 23, p. 115-121, 1975.

PARTYKA, A.; NIŻAŃSKI, W.; OCHOTA, M. Methods of Assessment of Cryopreserved Semen. In: KATKOV, I. (Ed.). **Current Frontiers in Cryobiology**, Rijeka, Croácia, 2012. cap. 20, p.547-574. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-in-cryobiology/methods-of-assessment-of-cryopreserved-semen>>. Acesso em 18 de janeiro de 2016.

PAYAN-CARREIRA, R.; BORGES, P.; MIR, F.; FONTBONNE, A. Molecular Markers in SpermAnalysis. In: LEMMA, A. (Ed.). **Success in Artificial Insemination – Quality of Semen and Diagnostics Employed**. Rijeka, Croácia, 2013. cap. 6, p.93-115. Disponível em: <<http://intechopen.com/books/success-in-artificial-insemination-quality-of-semen-and-diagnostics-employed/molecular-markers-in-sperm-analysis>>. Acesso em 15 de janeiro de 2016.

PEÑA F. J.; PLAZA DAVILA, M.; BALL, B. A.; SQUIRES, E. L.; MARTIN MUÑOZ, P.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; BALAO DA SILVA, C. The impact of reproductive Technologies on stallion mitochondrial function. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 50, p. 529-537, 2015.

PERTOFT, H. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**. v. 44, p. 1-30, 2000.

PIMENTEL C. A. Aspectos da patologia espermática e a fertilidade no garanhão. In: **Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**; Belo Horizonte. Belo Horizonte: CBRA; v.8, p.127-32, 1989.

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

POMMER, A. C.; RUTLLAND, J.; MEYERS, A. S. The role of osmotic resistance on equine spermatozoa function. **Theriogenology**. v. 58, p. 1373-1384, 2002a.

POMMER, A. C.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Capacitation and acrosome exocytosis are enhanced by in-cubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. **Theriogenology**. v. 57, p. 1493-1501, 2002b.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON, B.; PERTOFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 9, p. 297-308, 1997.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**. v. 65, p. 462-470, 2001.

RICCI, G.; PERTICARARI, S.; FRAGONAS, E.; GIOLO, E.; CANOVA, S.; POZZOBON, C. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. **Human Reproduction**. v. 17, p. 2665-2672, 2002.

RIVLIN, J.; MENDEL, J. RUBINSTEIN, S. ETKOVITZ, N.; BREITBART, H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**. v. 70, p. 518–22, 2004.

SAID, T. M.; PAASCH, U.; GLANDER, H. J.; AGARWAL, A. Role of caspases in male infertility. **Human Reproduction Update**. v. 10, p. 39-51, 2004.

SAMARDJIZA, M.; KARADJOLE, M.; MATKOVIC, M.; CERGOLI, M.; GETZ, I.; DOBRANIC, T.; TOMASKOVIC, A.; PETRICJ.; SURINA, J.; GRIZELJ, J.; KARADJOLE, T. A comparison of BovinePure and Percoll on bull sperm separation protocols for IFV. **Animal Reproduction Science**. v. 91, p. 237-247, 2006.

SAMPAIO, B. F. B. **Adição de lipídeos ao diluente de congelação de sêmen de garanhões**. 2012. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

SAMPER, J. C.; GARCIA, A. Post-thaw characteristics and fertility of stallion semen frozen in extenders with different cryoprotectants. **Animal Reproduction Science**. v.107, p. 348-349, 2008.

SAKKAS, D.; MANICARDI, G. C.; TOMLINSON, M.; MANDRIOLI, M.; BIZARRO, D.; BIANCHI, U. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and DNA anomalies. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1112-1116, 2000.

SCHERZER, J.; FAYRER-HOSKEN, R. A.; ACEVES, M.; HURLEY, D. J.; RAY, L. E.; JONES, L. Freezing equine semen: the effect of combinations of semen extenders and glycerol on post-thaw motility. **Australian Veterinary Journal**. v. 87, p. 275-279, 2009.

SIEME, HARALD, OLDENHOF, HARRIETTE, WOLKERS, WILLEM, F. M. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**.<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>

SILVA, A. R.; CARDOSO, R .C. S; UCHOA, D. C.; SILVA, L. D. M. Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addiction during the freezing process. **Theriogenology**. v. 59, p. 821-829, 2003.

SQUIRES, E. L.; KEITH, S. L.'GRAHAM, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**. v. 62, p. 1056-1065, 2004.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. **Human Reproduction Update**. v. 14, p. 243-258, 2008.

VAN WIENEN, M.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; PARLEVLIT, J.; MORRELL, J. M. Single Layer centrifugation with Androcoll-P can be scaled-up to process larger volumes or boar semen. **ISRN Veterinary Science**. p.1-8, 2011.

VARNER, D. .; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; HARTMAN, D. L.; BLISS, D. Semen processing for the subfertile stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.28, p. 677-685, 2008.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**. v. 54, p. 907-919. 2000.

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J. M.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**. v. 58, p. 249-251, 2002.

VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; MARTIN, F. X.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**. v. 112, p. 22-35, 2009.

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

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

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of Bull and boar semen. **Veterinary Quarterly**. v. 19, p.135-138, 1997.

WONGTAWAN, T.; SARAIVA, F.; WALLGREN, M.; CABALLERO, I.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. **Theriogenology**. v. 65, p. 773-787, 2006.