

FLÁVIA VIEIRA DE FREITAS

**O USO DO COLESTEROL CARREADO PELA CICLODEXTRINA NA
VIABILIDADE DO ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DE JUMENTOS
DA RAÇA PÊGA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

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

T

F884u
2017 Freitas, Flávia Vieira de, 1991-
O uso do colesterol carregado pela ciclodextrina na
viabilidade do espermatozoide criopreservado de
jumentos da raça Pêga / Flávia Vieira de Freitas. -
Viçosa, MG, 2017.

xvii, 68f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f.45-62.

1. Jumento - Reprodução. 2. Criopreservação.
3. Espermatozoide. 4. Colesterol. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

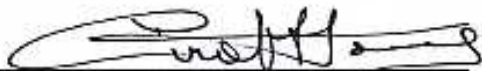
CDD 22. ed. 636.18

FLÁVIA VIEIRA DE FREITAS

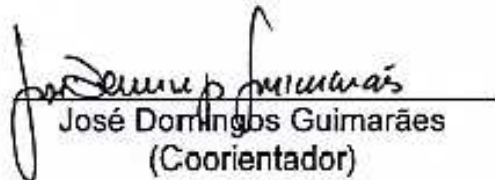
**O USO DO COLESTEROL CARREADO PELA CICLODEXTRINA NA
VIABILIDADE DO ESPERMATOZOIDE CRIOPRESERVADO DE JUMENTOS
DA RAÇA PÊGA**

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2017.



Ciro Alexandre Alves Torres
(Coorientador)



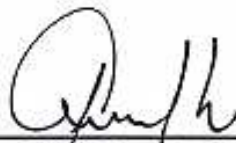
José Domingos Guimarães
(Coorientador)



Eduardo Paulino da Costa



Bruna Waddington de Freitas



Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

**Dedico este trabalho, com todo amor, aos meus maiores incentivadores:
minha família!**

Ao meu avô Bené (*in memoriam*), minha avó Bebel, minha mãe e maior exemplo, Carminha, meus irmãos Pedro e Vitor e meu amor, André.

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais.

***Mas, se você tiver grandes sonhos...
Seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão
oportunidades, seus medos produzirão coragem.***

Nunca desista dos seus sonhos!”

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Ao responsável por tudo que me rodeia: Deus! A Ele devo toda a minha vida!

De todos os meus exemplos, minha mãe é o maior deles. Espero que Deus me abençoe com, pelo menos, um pouco da sua força! Te amo!

Aos meus dois irmãos caçulas, Pedro e Vitor. Obrigada por não medirem esforços para me ajudar e estarem sempre presentes. Amo vocês!

Aos meus pedacinhos de céu, meus avós Sr. Bené e D. Isabel. Vô, queria que o senhor estivesse aqui, para podermos comemorar juntos todas as conquistas! Amo vocês!

Gostaria de agradecer aos meus tios do coração! Minha tia Dudu, meu tio Ronilson e minha tia Celinha, meu tio Ronaldo e minha tia Cris. O meu “muito obrigada” ainda é pouco perto do que fizeram por nós!

Um agradecimento especial vai para meu companheiro, André. Agradeço os momentos que estive comigo e por mim! Te amo! Agradeço também à sua família, Cida, sr. Márcio e Alysson, que me acolheram e me tratam com tanto carinho! Amo vocês!

À Medicina Veterinária e à UFV, que me abriram as portas para um mundo de possibilidades. Sou eternamente grata por tudo que passei durante os anos que vivi neste ambiente.

Ao Departamento de Zootecnia/UFV por me receber com carinho e aos funcionários do DZO, em especial a Fernanda, Mariana, Rosana, Venâncio, Alda, Vinícius, Gabriel, Rosi e sr Jorge pela ajuda durante estes dois anos de mestrado.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos, imprescindível para o desenvolvimento dos trabalhos ao longo destes dois anos.

À Ana Paula Lobato, minha Cotoca, grande amiga! Amo você!

Às minhas amigas da graduação e da vida: Fê (lindinha), Vivi (cacatua), Nubia (Brouzinha) e Marcela (chaveirinho). Amo vocês!

Aos meus professores da graduação, em especial ao meu orientador na iniciação científica, JD, pelo voto de confiança em meu trabalho. Agradeço ainda pela co-orientação no mestrado e por todas as conversas com sugestões, auxílios e apoios. Um orgulho ter sido sua orientada!

À Bruna, um ser iluminado! Mulher forte, inteligente, dedicada e amiga, que me ajudou desde a graduação nas mais diversas tarefas. Tirou dúvidas, me acalmou, ajudou nos congelamentos e na dissertação e me animou quando precisei. A você o meu Muito obrigada! Conte comigo quando precisar!

À Lu, minha amiga que e ajudou muito! Lu, vc faz falta em Viçosa, mas mesmo à distância sua presença é única!! Me inspiro muito em você e na Bruna!

Aos funcionários do DVT, em especial Sr. Didi, Celinho, Zé, Rosi, Bete, pela ajuda durante estes 7 anos de UFV.

Ao professor Ciro, do DZO, por ser um grande amigo e professor! Pela co-orientação, conselhos, idéias e por não me deixar desanimar nunca! O senhor é um exemplo para mim! Um orgulho ter sido sua aluna!

A um dos lugares que mais amo nesta UFV: Setor de Equideocultura!

Ao Professor Giovanni, que mesmo em um momento delicado, me orientou e sempre se mostrou disponível em ajudar nos mais diversos questionamentos. O senhor é um exemplo para quem o rodeia e tenho orgulho de ter sido sua orientada. Obrigada!

Um agradecimento super especial ao Fernando, funcionário responsável pelo setor. No início meu chefe e hoje um amigo e tanto! Fernando, sempre com conselhos, orações, torcidas e, também, “chamadas de atenção”, para que eu pudesse crescer e amadurecer. Peço a Deus que o abençoe sempre e te proporcione somente coisas boas nesta vida. Obrigada por tudo!

Ao Cristian, funcionário responsável pelo setor e também companheiro de estágio e de trabalho! Agradeço pela ajuda em todos os momentos de sufoco e pela paciência em me ajudar em aulas, dúvidas e na prática também! Agradeço também à sua família, pelo carinho comigo e com o pessoal da Equideo!

Aos funcionários da Equideo, imprescindíveis para o setor e para o bom convívio: Arcínio, Bernardo, Sílvio, Roberto e Sebastião.

Aos meus colegas de pós-graduação: Manu, Maria, Carlos e Duda, pelas orientações, sugestões e ajudas nos momentos de sufoco. Em especial à Duda, que tomou para si a responsabilidade dos congelamentos e me acompanhou até o fim!

Aos ex e atuais estagiários da Equideo: Amanda, Bia, Bruno, Celina, Dani, Domingos, Gabriela, Henrique, Ilana, Júnior, Larissa, Leandro F., Leandro P. Lorraine, Lucas Biscotto, Mariana, Mírian, Pablo, Pedro, Pedro Turquia, Rachel, Thiago A. e Thiago Vieira. Vocês foram fundamentais para meu amadurecimento pessoal e profissional, e por tornar mais leve a rotina de trabalho. Um agradecimento especial ao Charles Müller (*in memoriam*). Sei que está olhando por nós de onde estiver! Obrigada, família Equideo!

Às minhas Xeretas: Amanda, Duda e Larissa. Amo vcs!

À Universidade de São Paulo, Professor Dr. André Furugen e sua equipe de trabalho, que me acolheram em suas instalações e me auxiliaram nas análises das amostras. Professor André, Simone, Mariana, Marina, Gisele, Ana, Diego, Bruno, Maitê, Cristian, Biroca, Fabinho, Chiquinho, agradeço imensamente as risadas, conselhos, aprendizados, ajuda com as amostras e com a adaptação a uma nova realidade. Em especial agradeço a Mariana e Marina pela ajuda com as análises, além da Simone, pela ajuda com a estatística!

Aos Professores Drs. Flávio Meirelles e Felipe Perecin por permitirem a utilização das instalações e equipamento de citometria de fluxo.

À Botupharma, em nome do Edilson e do Professor Dr. José Dell'aqua, por gentilmente cederem os diluentes de centrifugação e congelamento utilizados no projeto.

Ao Sr. Luís Felipe Haddad e os funcionários do Haras Tarumã, que cederam os animais para o experimento e auxiliaram nas coletas de sêmen.

Por último, e não menos importante, agradeço aos animais. Toda a minha energia se renova quando estou com vocês!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Morfologia da célula espermática.....	3
2.2. A membrana plasmática do espermatozóide e a criopreservação.....	5
2.3. Capacitação espermática e reação acrossomal.....	7
2.4. O estresse oxidativo e a peroxidação lipídica	9
2.5. O papel do colesterol na criopreservação.....	10
2.6. A ciclodextrina e o colesterol.....	11
2.7. Avaliação espermática.....	13
2.7.1. CASA – <i>Computer Assisted Sperm Analyser</i>	13
2.7.2. Citometria de Fluxo.....	15
2.7.2.1. Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal.....	17
2.7.2.2. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio	18
2.7.2.3. Avaliação da peroxidação lipídica.....	19
2.7.2.4. Avaliação da organização da bicamada lipídica.....	20
2.7.2.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	20
2.7.2.6. Avaliação da apoptose celular.....	21
3. FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Delineamento experimental.....	24
4.2. Instalações e manejo dos animais.....	24
4.3. Processamento da ciclodextrina para incorporação do colesterol	25

4.4.	Colheita e avaliações imediatas do sêmen.....	25
4.5.	Congelamento de sêmen.....	26
4.6.	Descongelo do sêmen.....	27
4.7.	Análise computadorizada da cinética espermática (CASA).....	28
4.8.	Citometria de fluxo.....	29
4.8.1.	Avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal (IP/FITC-PSA).....	30
4.8.2.	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (DHE/YP).....	31
4.8.3.	Avaliação da peroxidação da membrana plasmática (C11-BODIPY ^{581/591} /PI).....	31
4.8.4.	Avaliação da organização da bicamada lipídica (M540/YP).....	32
4.8.5.	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (JC-1/PI).....	32
4.8.6.	Avaliação da apoptose celular (Yo-Pro).....	33
4.9.	Análise estatística.....	33
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1.	Análise computadorizada da cinética espermática (CASA).....	34
5.2.	Citometria de Fluxo.....	37
5.3.	Conclusões.....	44
6.	Referências bibliográficas.....	45
	ANEXOS.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
$\Delta\Psi\text{m}$	Potencial de membrana mitocondrial
ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
BCF	Frequência de batimento flagelar
BODIPY ^{581 / 591}	4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno-3-undecanoico
BSA	Albumina sérica bovina
Ca^{2+}	Íon Cálcio
CASA	Análise computadorizada do sêmen
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CCC	Ciclodextrina carregada com colesterol
CHOL	Colesterol
DHE	Diidroetídeo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Fluoresceína
g	Força centrífuga
HIPER	Hiperativação
Hz	Hertz
IP	Iodeto de propídeo
JC-1	5,5',6,6'-tetra-chloro-1,1',3,3'-iodeto de carbocianato de tetraetilbenzomidazol
Kg	Quilogramas
L	Litro
LIN	Linearidade
M540	Merocianina
mg	Miligramas

mL	Mililitros
mOsm	Miliosmol
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
p	Nível de significância
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
PKA	Proteína quinase
PSA	<i>Pisum sativum</i>
s	Segundo
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
Sptz	Espermatozóide
STR	Retilinearidade
TALP	Meio Tyrode – albumina – lactato – piruvato
VAP	Velocidade média do trajeto
VCL	Velocidade curvilinear
VSL	Velocidade progressiva
YP	Yo-Pro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
±	Mais ou menos
/	Por
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Médias \pm desvio-padrão das características avaliadas no sêmen fresco de jumentos da raça Pêga.....34
- Tabela 2** – Médias \pm desvio-padrão das características de cinética espermática do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga, fornecidas pelo programa *Sperm Class Analyser* (SCA).....35
- Tabela 3** – Médias \pm desvio-padrão das categorias de células AIML, ARML, AIMI, ARMI do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.....37
- Tabela 4** – Médias \pm desvio-padrão da porcentagem de categorias de células DEAD (Espermatozoides mortos); LIVE-DHE+ (espermatozoides vivos com produção de espécies reativas de oxigênio); LIVE (espermatozoides vivos) do sêmen descongelado de jumentos da Raça Pêga.....39
- Tabela 5** – Médias \pm desvio-padrão da porcentagem de categorias de células:LAHP (Espermatozoides vivos com alto potencial de membrana); ALP (Espermatozoides vivos com baixo potencial de membrana); DEAD (espermatozoides mortos) do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.....41
- Tabela 6** – Medianas \pm desvio-padrão da peroxidação lipídica, medida em de intensidade de fluorescência, do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.....42
- Tabela 7** – Médias \pm desvio-padrão das porcentagens de células nas três categorias: LIVE-CAP (células viáveis e capacitadas: YP-/M540+); LIVE (células viáveis não capacitadas: YP-/M540-); DEAD (células não viáveis e não capacitadas: YP+/M540-) do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.....43
- Tabela 8** – Médias \pm desvio-padrão das porcentagens de células viáveis (LIVE), células não viáveis (DEAD) e apoptóticas (APOPPTO) do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.....44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma dos experimentos.....	23
Figura 2 – Imagem da cinética espermática fornecida pelo <i>Sperm Class Analyser</i> (SCA - Microptic [®] , Microptic S.L., Barcelona, Espanha).....	29
Figura 4 – Aparelho BDAccuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA) utilizado para análise das amostras por citometria de fluxo.....	30

RESUMO

FREITAS, Flávia Vieira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **O uso do colesterol carregado pela ciclodextrina na viabilidade do espermatozoide criopreservado de jumentos da raça Pêga.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Coorientadores: Ciro Alexandre Alves Torres e José Domingos Guimarães.

Inúmeras biotécnicas visam obter melhores índices de viabilidade espermática pós-descongelamento. Diferenças de características bioquímicas e funcionais entre espécies, ejaculados, estações do ano, animais, e outros, não possibilitaram o desenvolvimento de um protocolo definitivo. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da inclusão de colesterol na criopreservação do sêmen asinino sobre a viabilidade espermática in vitro pós-descongelamento. Vinte e cinco ejaculados de cinco jumentos foram divididos em dois tratamentos experimentais: T1: controle sem adição de ciclodextrina carregada com colesterol – (CCC); e T2 com adição de CCC. As avaliações seminais pós-descongelamento foram divididas em duas fases (1 e 2). Na fase 1 avaliou-se os efeitos da incorporação ou não de 1,5 mg de CCC aos espermatozoides, avaliando a cinética espermática dos espermatozoides no pós-descongelamento. As amostras descongeladas dos dois tratamentos foram submetidas ao *Computer Assisted Sperm Analyser* (CASA) e obteve-se as variáveis motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm) e frequência de batimentos (BCF, Hz). Na fase 2 as amostras dos dois tratamentos foram submetidas à incubação com diferentes sondas e posterior análise por citometria de fluxo para avaliação: da integridade da membrana plasmática e acrossomal (FITC-PSA), do estresse oxidativo citoplasmático (DHE), da peroxidação dos lipídios de membrana (BODIPY^{581/591}), da organização da bicamada lipídica (M540), do potencial de membrana mitocondrial (JC-1) e da apoptose celular (Yo-Pro). Os resultados relativos à avaliação da cinética espermática dos tratamentos experimentais mostraram que os parâmetros MT, MP, VCL, VSL, VAP, ALH, e BCF apresentaram maiores valores ($p < 0,05$) no T1 ($29,92 \pm 13,82$; $12,44 \pm 6,03$; $64,45 \pm 9,65$; $43,50 \pm 7,30$; $52,02 \pm 8,17$; $2,65 \pm 0,48$; $7,67 \pm 0,76$) em relação ao T2

(17,33 ± 7,18; 5,33 ± 2,69; 46,16 ± 8,16; 31,83 ± 6,73; 38,76 ± 7,63; 1,63 ± 0,43; 6,51 ± 1,76). Não foram observadas diferenças nos ejaculados ($p > 0,05$) entre o T1 e T2 para as variáveis LIN (67,60 ± 1,28 e 68,74 ± 1,61) e STR (83,55 ± 0,81 e 81,91 ± 1,05). Na fase 2, a incorporação de colesterol resultou em maior ($p < 0,05$) porcentagem de células com integridade de membrana acrossomal e plasmática dos espermatozoides (21,42 ± 12,94), bem como maior ($p < 0,05$) potencial de sua membrana mitocondrial (15,49 ± 12,36). Não houve diferença ($p > 0,05$) entre o T1 e T2 em relação à peroxidação dos lipídeos de membrana (669,81 ± 337,87 e 743,42 ± 417,26) e quanto à desorganização da membrana plasmática (8163,07 ± 1929,75 e 7068,01 ± 3680,08). A incorporação de colesterol resultou em maior ($p < 0,05$) produção de espécies reativas de oxigênio citoplasmático (%) no T2 (3,73 ± 1,64) em relação ao T1 (2,10 ± 1,20). Além disso, a incorporação do colesterol se mostrou eficaz em aumentar ($p < 0,05$) a porcentagem de células vivas pós descongelamento (23,67 ± 12,46) em relação ao grupo que não recebeu o tratamento (12,69 ± 8,84). Não houve diferença ($p > 0,05$) entre T1 e T2 em relação à prevenção dos eventos semelhantes a apoptose nos espermatozoides (23,28 ± 9,81 e 22,08 ± 12,24). A incorporação de colesterol ao sêmen melhora os parâmetros seminais *in vitro* do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

ABSTRACT

FREITAS, Flávia Vieira de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Use of cyclodextrin loaded cholesterol in the viability of Pêga donkeys cryopreserved spermatozoa.** Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-advisers: Ciro Alexandre Alves Torres and José Domingos Guimarães.

Many biotechniques are directed to obtain better rates of sperm viability after thawing. Differences in biochemical and functional characteristics between species, ejaculates, seasons of the year, among animals, and others, preclude a definitive protocol. The objective of this study was to evaluate the effects of cholesterol inclusion on cryopreserved Pêga donkey spermatozoa and sperm viability *in vitro* post-thawing. Twenty five ejaculates of five donkeys were divided in two experimental treatments, T1: control, without addition of cyclodextrin loaded cholesterol – (CCC) and T2: treated with addition of CCC. Post-thawing seminal evaluations were divided into two phases (1 and 2). The effects of incorporation (T2) or not (T1) of 1.5 mg of CCC to the semen on sperm kinetics of post-thawing spermatozoa were evaluated. In phase 1, samples of the two treatments were submitted to the Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) and the kinetic characteristics: total motility (MT, %), progressive motility (MP, %), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), progressive velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), trajectory velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), linearity (LIN, %), rectilinearity (STR, %), amplitude of lateral head displacement (ALH, μm) and beating frequency (BCF, Hz) were obtained. In phase 2, samples of the two treatments were submitted to incubation with different probes and later analysed by flow cytometry to evaluate the plasma and acrosomal membrane integrity (FITC-PSA), cytoplasmic oxidative stress (DHE), plasma membrane lipid peroxidation (BODIPY^{581/591}), lipid bilayer organization (M540), mitochondrial membrane potential (JC-1) and cellular apoptosis (Yo-Pro). Results regarding the evaluation of spermatoc kinetics of the experimental treatments showed the parameters MT, MP, VCL, VSL, VAP, ALH and BCF were higher ($p < 0,05$) in T1 ($29,92 \pm 13,82$; $12,44 \pm 6,03$; $64,45 \pm 9,65$; $43,50 \pm 7,30$; $52,02 \pm 8,17$; $2,65 \pm 0,48$; $7,67 \pm 0,76$) in relation to T2 ($17,33 \pm 7,18$; $5,33 \pm 2,69$; $46,16 \pm 8,16$; $31,83 \pm 6,73$; $38,76 \pm 7,63$; $1,63 \pm 0,43$; $6,51 \pm 1,76$). No differences were shown ($p > 0,05$) between T1 e T2 for the LIN ($67,60 \pm 1,28$ e $68,74 \pm 1,61$) and STR ($83,55 \pm 0,81$ e $81,91 \pm 1,05$) variables. In phase

2, the incorporation of cholesterol resulted in greater ($p < 0.05$) percentage of integrity on the spermatozoa acrosomal and plasma membrane ($21,42 \pm 12,94$), as well as higher ($p < 0.05$) potential of its mitochondrial membrane ($15,49 \pm 12,36$). No difference was detected ($p > 0.05$) between T1 e T2 in relation to membrane lipid peroxidation ($669,81 \pm 337,87$ e $743,42 \pm 417,26$) and plasma membrane disorganization ($8163,07 \pm 1929,75$ e $7068,01 \pm 3680,08$). Cholesterol incorporation resulted in higher ($p < 0.05$) production of reactive cytoplasmic oxygen species % in T2 ($3,73 \pm 1,64$) in relation to the T1 ($2,10 \pm 1,20$) spermatozoa. In addition, cholesterol incorporation was effective in increasing ($p < 0.05$) the percentage of post-thaw live cells ($23,67 \pm 12,46$) in relation to T1 ($12,69 \pm 8,84$). No difference was detected ($p > 0.05$) between T1 e T2 regarding the prevention of apoptosis-like events in spermatozoa ($23,28 \pm 9,81$ e $22,08 \pm 12,24$). The incorporation of cholesterol to the semen improves seminal parameters of *in vitro* of post-thawing donkey semen.

1. INTRODUÇÃO

O Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA – Esalq/USP) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em levantamento de dados realizado no ano de 2013, concluíram que o efetivo do rebanho equino no Brasil é composto por cerca de 5,3 milhões de animais e, segundo dados da FAO (2014), existem cerca de 1,3 milhões de muares e 1,2 milhões de asininos no país. Portanto, o rebanho equídeo total do Brasil está em torno de 7,8 milhões de cabeças, configurando-se como um dos maiores do mundo.

Neste contexto, destaca-se a importância da manutenção da tropa nacional, que, mesmo em desenvolvimento concomitante à várias tecnologias agropecuárias, mantém sua contribuição no cenário rural, de esportes e lazer. A atividade movimenta em torno de R\$ 16 bilhões de reais anualmente e se firma como um dos segmentos mais relevantes do complexo do agronegócio brasileiro (CEPEA & MAPA, 2013). Este enorme crescimento do efetivo do rebanho aconteceu graças às diversas biotecnologias da produção desenvolvidas ao longo dos anos, que trouxeram maior melhoramento genético das populações, sendo possível obter animais superiores e de melhor desempenho dentro dos centros criatórios. Com maior valor agregado aos animais e à produção, investimentos nas mais diversas áreas têm sido feito para, cada vez mais, se alcançar melhores resultados. Além dos investimentos já citados, os profissionais envolvidos nestes segmentos buscam se aperfeiçoar e habituar às tecnologias emergentes, sendo possível ofertar uma maior qualidade e flexibilidade de serviços prestados.

Paralelamente a este cenário econômico, tem se tornado crescente a valorização de asininos no país, especialmente da raça Pêga, em função da visível melhora nos padrões zootécnicos e ganho no potencial genético que os animais têm apresentado em competições de morfologia e andamento (MACHADO, 2010). Além disso, a produção de muares de qualidade para o trabalho em áreas rurais tem sido cada vez mais valorizada, em função da sua força física e extrema resistência a cargas pesadas de trabalho (CANISSO *et al.*, 2010).

Porém, a simples transferência de tecnologias desenvolvidas em determinada espécie para outra raramente gera resultados satisfatórios, uma vez que as diferenças fisiológicas existem até mesmo entre espécies similares (WILDT *et al.*, 1995). Tal fato explica o que ocorre entre os equídeos: os protocolos de congelamento de sêmen utilizados em garanhões resultam em baixas taxas de gestação em asininos (TRIMECHE *et al.*, 1998) quando comparado com o uso de sêmen fresco ou resfriado (VIDAMENT *et al.*, 2009).

Dentre as causas associadas à redução da fertilidade do sêmen congelado encontram-se os danos ocasionados à membrana plasmática (WATSON *et al.*, 1981) decorrentes do choque térmico inerente ao processo de criopreservação. A sensibilidade espermática frente às curvas de resfriamento e congelamento é associada à composição dos lipídeos da membrana plasmática, principalmente em relação à proporção colesterol:fosfolípídeo, a qual influencia diretamente a sua fluidez e estabilidade (GRAHAM e FOOTE, 1987). Espécies com baixa (suínos e equinos), intermediária (bovinos, ovinos e caprinos) e alta (homem, camundongo, galo e coelho) relação colesterol: fosfolípídeos variam nessa ordem quanto à susceptibilidade ao choque térmico (RATES, 2011). Além da baixa relação colesterol:fosfolípídeo, estudos demonstram que a criopreservação leva à redução do conteúdo de colesterol da membrana plasmática (MOORE *et al.*, 2005; SRIVASTAVA *et al.*, 2013), ocasionando o fenômeno denominado criocapacitação, que reduz a viabilidade espermática pós-descongelamento (BAILEY *et al.*, 2000).

Em função disso, a inclusão de colesterol no diluidor tem sido indicada como alternativa para aumentar a estabilidade da membrana espermática durante o resfriamento e, conseqüentemente, melhorar a qualidade seminal pós-descongelamento de asininos (ÁLVAREZ *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2010), equinos (MOORE *et al.*, 2005; AMORIM, 2008; GLAZAR *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2010; SPIZZIRI *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2015), bovinos (PURDY & GRAHAM, 2004; PURDY *et al.*, 2005; MOCÉ & GRAHAM, 2006; AMORIM *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2010), caprinos (MORRIER & BAILEY, 2005; MOCÉ *et al.*, 2010), ovinos (BATISSACO, 2014), suínos (ZENG & TERADA, 2001; MAO *et al.*, 2005; WALTERS *et al.*, 2008; MORAES *et al.*, 2009; TORRES *et al.*, 2009), camundongos (MOVASSAGHI *et al.*, 2009) e coelhos (MOCÉ & GRAHAM, 2005).

Entretanto, apesar dos efeitos benéficos da inclusão de colesterol à membrana espermática, o seu conteúdo elevado pode ser prejudicial ao espermatozoide (PARKS *et al.*, 1981) e contribuir para a redução da fertilidade seminal (BRINSKO *et al.*, 2007) por induzir um estado de decapacitação, inibindo a reação acrossomal (DAVIS, 1980). Brinsko *et al.* (2007) concluíram que altos níveis de colesterol interferem no processo fisiológico de capacitação e reação acrossomal, ao constatarem proporções colesterol:fosfolípideo duas vezes maiores em espermatozoides de garanhões inférteis quando comparados aos animais férteis. Além disso, estudos de fertilidade *in vivo* demonstraram nenhum benefício ou até mesmo efeito negativo do tratamento do sêmen criopreservado com inclusão de colesterol (ZHAN *et al.*, 2002; SPIZZIRI *et al.*, 2010; RATES, 2011).

Diante dos fatos expostos, o presente estudo teve como objetivos principais a avaliação *in vitro* dos efeitos decorrentes da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoides criopreservados de jumentos da raça Pêga quanto aos parâmetros de cinética espermática pós-descongelamento e quanto às características de integridade de membrana plasmática e acrossomal, avaliação do estresse oxidativo no citosol, lipoperoxidação da membrana plasmática, organização da bicamada lipídica, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e avaliação da apoptose celular.

Com os resultados do presente estudo, será possível prever com maior acurácia o potencial *in vitro* de fertilidade do sêmen incorporado com colesterol de jumentos da raça Pêga e a viabilidade da técnica na rotina de trabalho dos profissionais que lidam diretamente com a espécie, o que poderia trazer ganhos genéticos e melhores índices produtivos para o setor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Morfologia da célula espermática

Os espermatozoides são células altamente especializadas, que apresentam formato alongado. Estas células podem ser, basicamente, divididas em duas regiões anatômicas e funcionais: cabeça e cauda (composta por peça

intermediária, peça principal e a peça terminal) (MORTIMER, 1997; ALBERTS *et al*, 2004).

A cabeça dos espermatozoides contém o material genético altamente condensado, que deve ser transferido ao oócito durante o momento da fecundação. A condensação do material genético é necessária para diminuir o volume a ser carregado durante o transporte da célula ao longo do seu trajeto e é possível graças ao auxílio de proteínas simples de carga positiva, as protaminas. Na cabeça ainda há uma estrutura conhecida como acrossoma, um grânulo secretório, delimitado externamente pela membrana plasmática e internamente recobre a borda anterior do envelope nuclear. É uma estrutura originada do Complexo de Golgi, e é formada durante a fase de espermátide e, tem como função, liberar enzimas hidrolíticas, que entrarão em contato com a zona pelúcida do oócito durante a fecundação. Durante o processo de ligação entre a célula espermática e o oócito, o gameta masculino sofre a reação acrossomal e libera o conteúdo contido no acrossoma por exocitose, facilitando a ligação entre os gametas (ALBERTS *et al*, 2004).

A cauda do espermatozoide é uma estrutura essencial para o deslocamento da célula espermática e, para isso, conta com o auxílio de outras estruturas. Um dos componentes da cauda é o colo, estrutura abaulada que se liga intimamente com a cabeça do espermatozoide e o restante do flagelo. É formado pelo *capitulum*, uma estrutura fibrosa densa e que fornece a forma a região de implantação da cauda a cabeça, e por colunas segmentadas, originadas do centríolo proximal da espermátide (ALBERTS *et al*, 2004).

A partir do colo é possível identificar o axonema, estrutura composta por 9 pares de microtúbulos periféricos que rodeiam um par de microtúbulos central. O que difere o flagelo do espermatozoide dos cílios e flagelos de plantas e animais é o fato de que o flagelo dos espermatozoides conta com outras três outras estruturas, como fibras densas externas compostas principalmente de queratina (dispostas sobre os 9 pares de microtúbulos), a bainha mitocondrial (localizada na peça intermediária) e uma bainha fibrosa ou *annulus*, presente na peça principal (ALBERTS *et al*, 2004).

A peça intermediária está situada entre o colo e o *annulus* e é composta por uma bainha de mitocôndrias, que envolve as fibras densas externas. As mitocôndrias são altamente especializadas na produção de energia, na forma de ATP, que é fornecido às proteínas chamadas dineína e tubulina, responsáveis por hidrolisar este composto e promover o deslizamento dos microtúbulos e consequente movimento flagelar (GAGNON, 1995).

A peça principal se constitui na maior parte do flagelo da célula espermática e é composta principalmente da bainha fibrosa. Esta, no começo da peça principal, substitui duas das fibras densas externas. A bainha tem como função fornecer estabilidade ao flagelo, auxiliando na movimentação espermática (ALBERTS *et al*, 2004).

A peça final do flagelo é composta pelo axonema e membrana plasmática apenas.

2.2. A membrana plasmática do espermatozoide e a criopreservação

A membrana plasmática é uma estrutura que recobre toda a extensão da célula espermática e desempenha funções vitais, promovendo uma adequação do espermatozoide ao meio que o rodeia e mantém o ambiente intracelular com características diferentes do meio extracelular (AMANN e GRAHAM, 1992; ALBERTS *et al.*, 2004). Submetido a diferentes protocolos de utilização (como sêmen fresco, resfriado e congelado), é esperado que a célula espermática sofra inúmeras modificações estruturais para se adaptar às diversas situações, e a membrana plasmática é essencial neste remodelamento.

O modelo amplamente aceito de estrutura da membrana plasmática da maioria das células foi proposto por SINGER e NICHOLSON (1972), no qual lipídeos de natureza anfipática estão dispostos em uma camada dupla e dividem o espaço com proteínas integrais e periféricas, e permanecem ligados por ligações de natureza não covalente. Neste modelo de membrana plasmática, ainda estão entremeadas, entre os fosfolipídios, moléculas de colesterol, que desempenham importante papel na estabilização das membranas biológicas (PARKS e GRAHAM, 1992; SQUIRES *et al.*, 1999).

Os lipídeos e proteínas da membrana se comportam de forma a estabelecer conexões entre si e, com isso, compartimentalizam a membrana e criam domínios funcionais específicos de cada região, que garantem a adequada funcionalidade da célula (PARKS e GRAHAM, 1992; ALBERTS *et al.*, 2004). Esta compartimentalização não é sincronizada e algumas áreas de assimetria na membrana podem ser identificadas: moléculas neutras ou com cargas positivas, como a fosfatidilcolina, esfingomiéline e glicosfingolipídios, se situam, preferencialmente, no folheto externo da membrana, enquanto os lipídeos de carga negativa, como a fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol, estão localizados na face interna do folheto da membrana (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990; PARKS & GRAHAM, 1992). O agrupamento em domínios é dependente da natureza e do grau de insaturação dos ácidos graxos que acompanham os fosfolipídios (ALBERTS *et al.*, 2004).

Esta conformação em domínios promove uma barreira para as substâncias, ou seja, aquelas substâncias hidrofílicas dificilmente passam pelos locais onde há maior concentração de fosfolipídios, tendo preferência pela passagem através dos canais formados pelas proteínas integrais de membrana. Já as substâncias hidrofóbicas tendem a ser internalizadas preferencialmente nas regiões onde se encontram os fosfolipídios. Este arranjo poderá sofrer mudanças deletérias durante a criopreservação, ocasionando um desbalanço na entrada e saída de substâncias (AMANN e PICKET, 1987).

Em condições de temperatura ambiente, a membrana se encontra no estado fluido, ou seja, com possibilidade de movimentação lateral dos fosfolipídios ao longo do mesmo folheto (AMANN e PICKET, 1987; PARKS e GRAHAM, 1992.). À medida que a célula espermática é submetida ao processo de criopreservação, e tem sua temperatura diminuída de 20° C para 8 – 5° C, a membrana plasmática deixa a fase fluida que se encontra e assume uma fase de gel (AMANN e PICKET, 1987; HAMMERSTEDT, 1990). Esta fase é chamada de fase de transição e é caracterizada por um rearranjo da estrutura de fosfolipídios e proteínas de membrana, com perda da distribuição aleatória destas estruturas (BAILEY *et al.*, 2000). As proteínas tendem a se agrupar em determinado local da membrana plasmática, com conseqüente aumento da

permeabilidade às substâncias nesta região, promovendo um desbalanceamento químico e metabólico da célula.

Considerando que existe uma ampla variedade de cadeias de ácidos graxos ligados aos fosfolipídios, com diferentes tamanhos e com variados graus de insaturação, cada um deles terá uma temperatura de transição diferente. Portanto, em determinada temperatura, nem todos os lipídios de membrana estarão em fase líquida cristalina, podendo haver regiões fluidas concomitantemente.

É necessária uma adequação das taxas de resfriamento e a classe de diluidores a serem utilizados no processo de criopreservação, com o intuito de amenizar a fase de transição que as células espermáticas passam e diminuir os danos causados pelo frio, conhecidos também como crioinjúria.

O resfriamento das células espermáticas tem maior impacto na fertilidade do que na porcentagem de células móveis após o descongelamento, portanto, a associação de diferentes técnicas para avaliação da fertilidade espermática assume grande importância para obtenção de bons índices após a criopreservação do sêmen.

2.3. Capacitação espermática e reação acrossomal

Após a espermatogênese, o espermatozoide é encaminhado ao epidídimo, local onde sofre a maturação e permanece até o momento de ser externalizado através da ejaculação (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

No momento da ejaculação, os espermatozoides entram em contato com as secreções das glândulas acessórias, detentoras de várias substâncias decapacitantes, entre outros constituintes. Estas substâncias têm como objetivo estabilizar a membrana espermática, evitando que a célula sofra capacitação precoce e diminua sua meia-vida. Assim, o espermatozoide consegue se manter viável ao passar pelas estruturas dos órgãos reprodutivos da fêmea e chegar ao local da fecundação com suas características preservadas (GADELLA & LUNA, 2014).

Na tuba uterina, os espermatozoides permanecem com baixa atividade metabólica. Próximo ao momento da ovulação, ocorre um aumento na secreção tubárica de fluido rico em bicarbonato, que é internalizado pelo espermatozoide. Uma vez dentro da célula espermática, o bicarbonato irá ativar a enzima adenilato ciclase para a produção de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP). O cAMP, por sua vez, ativa a proteína quinase (PKA) cAMP dependente e as demais cascatas de sinalização. Assim, o subsequente aumento na fosforilação da PKA resulta em aumento nos movimentos da cauda do espermatozoide, conhecido como hiperativação (POMMER *et al.*, 2002; GADELLA & LUNA, 2014).

Simultaneamente ao aumento da fosforilação da PKA, ocorre reorganização dos componentes da membrana plasmática, devido a uma perda de glicoproteínas, de colesterol, entre outros. Esta reação é dependente de Ca^{2+} e resulta em aumento da fluidez da membrana, levando a menor estabilidade da mesma (GADELLA & LUNA, 2014). As lipoproteínas de alta densidade e albumina secretadas junto ao fluido tubárico são as maiores responsáveis pela retirada do colesterol da membrana espermática (AMANN & GRAHAM, 1992).

A hiperativação se faz necessária para que o espermatozoide seja capaz de alcançar o oócito recém ovulado e é uma fase que precede a reação acrossomal.

A reação acrossomal acontece para que o envelope glicoproteico que recobre o oócito ovulado seja dissolvido. Desta forma, uma vez ligado à zona pelúcida, irá ocorrer influxo de Ca^{2+} para dentro da célula espermática e a reação acrossômica terá início, com liberação das enzimas responsáveis pela hidrólise das glicoproteínas da superfície do oócito (GADELLA & LUNA, 2014). Para que este evento seja possível, a membrana acrossomal deve estar intacta. Dentre os possíveis danos causados pela criopreservação, a lesão à membrana acrossomal é um deles, o que pode alterar a capacidade fertilizante do espermatozoide.

2.4. O estresse oxidativo e a peroxidação lipídica

O oxigênio (O_2) é um composto essencial à vida, porém, há uma grande busca pelo entendimento por completo de suas funções. Apesar de indiscutíveis seus benefícios para os mais diversos compartimentos corpóreos, o O_2 é capaz de produzir compostos citotóxicos, como as espécies reativas de oxigênio.

Em concentrações adequadas, as EROs estão envolvidas na sinalização celular e no desencadeamento da capacitação e reação acrossomal, nos espermatozoides. No instante em que a produção de EROs se torna exacerbada, ou seja, além do poder antioxidante da célula, esta passa a sofrer com os efeitos deletérios destes compostos. Dentre as EROs, pode-se destacar o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical peroxila (ROO^\cdot) e o radical hidroxila (OH^\cdot).

Alguns antioxidantes estão presentes nas células e no plasma seminal, e ajudam na prevenção de danos oxidativos decorrentes da ação das EROs. São elas: a enzima superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase, catalase, ácido ascórbico, α -tocoferol, taurina e albumina. No entanto, biotecnologias da reprodução, como a criopreservação, preconizam a retirada do plasma seminal (BAUMBER *et al.*, 2000). Além disso, por conter reduzido citoplasma em seu interior, o espermatozoide não apresenta elevada quantidade de antioxidantes, sendo uma célula susceptível ao estresse oxidativo.

Bilodeau *et al.* (2000) afirmam que em torno de 78 % de glutathiona peroxidase e 50 % de SOD são perdidas durante a criopreservação, o que pode estar relacionado a qualidade inferior do sêmen. Segundo os mesmos autores, a produção de EROs é capaz de prejudicar a motilidade total do sêmen, o potencial de membrana mitocondrial, a viabilidade e integridade do DNA.

Dentre os efeitos deletérios do estresse oxidativo, a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática parece ser um dos mais importantes desdobramentos. A peroxidação consiste, basicamente, em uma degradação autocatalítica da membrana plasmática, que altera a fluidez da mesma e pode levar à perda de função, comprometendo a capacidade fertilizante do espermatozoide.

Gibb *et al.* (2014), trabalhando com sêmen de garanhões, avaliaram a maior produção de EROs como uma característica satisfatória. Considerando que as EROs são produtos naturais do metabolismo das células, uma alta produção poderia estar relacionada a maior atividade metabólica por parte dos espermatozoides mais ativos. Neste mesmo estudo, a produção de EROs teve correlação positiva com a peroxidação lipídica. Os pesquisadores afirmaram que, *in vivo*, a produção de EROs está fortemente relacionada ao aumento da atividade mitocondrial e, portanto, são características de células mais ativas. Porém, acredita-se que os espermatozoides de equinos não sofram tanto com os efeitos das EROs devido à alta concentração de catalase presente em seu interior, que o torna moderadamente resistente à peroxidação lipídica (AITKEN *et al.*, 1987; ORTEGA-FERRUSOLA *et al.*, 2009).

Guthrie *et al.* (2012) acreditam que a redução na motilidade espermática pode ser devido a lesões secundárias a produção de EROs, que culminariam em incorreta utilização do ATP ou efeitos deletérios na capacidade contrátil do flagelo. Neste estudo, os pesquisadores afirmam que o pequeno tempo de exposição do sêmen às EROs foi capaz de prejudicar a motilidade, mas não foram suficientes para prejudicar a integridade de membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides, resultados que corroboram com os de BAUMBER *et al.*, (2000).

De forma contrária, alguns estudos demonstram que a formação de EROs podem influenciar negativamente a motilidade e a integridade das membranas plasmática e acrossomal de garanhões, ratos e humanos (LAMIRANDE & GANON, 1992; BOUARDI *et al.*, 1997; COCCHIA, *et al.*, 2011).

2.5. O papel do colesterol na criopreservação

A composição lipídica da membrana dos espermatozoides sofre modificações durante o trânsito ao longo do trato reprodutivo dos machos. A maior parte das modificações no conteúdo lipídico acontecem durante a maturação espermática no epidídimo (PARKS & GRAHAM, 1992). É possível afirmar, que a susceptibilidade à criopreservação aumenta à medida que o trajeto ao longo do epidídimo progride (QUINN & WHITE, 1967).

De acordo com Cerolini *et al.* (2001), as perdas de colesterol da membrana plasmática durante a criopreservação podem chegar a 50 % em cachacos. O mesmo autor afirma que este efluxo de colesterol é uma das principais causas da criocapacitação, evento responsável pela menor viabilidade da célula espermática no pós-descongelamento.

A distribuição do colesterol ao longo da membrana plasmática e entre as diferentes espécies não é uniforme e, portanto, diferentes susceptibilidades entre as espécies frente ao processo de criopreservação são evidenciadas na prática.

Humanos e coelhos apresentam relação colesterol:fosfolipídios, respectivamente, 0,99 e 0,88, e são consideradas espécies de alta resistência a criopreservação. Já espécies mais vulneráveis ao processo de criopreservação, como bovinos, equinos e suínos apresentam correlação colesterol:fosfolipídios em torno de 0,38 – 0,44 e 0,36 e 0,12, respectivamente (DARIN-BENNETT e WHITE, 1977; DE LEEUW *et al.*, 1990).

A resistência ao processo de criopreservação é oriunda do papel estabilizador da membrana plasmática que o colesterol desempenha. Uma vez presente em maiores concentrações, o colesterol tende a abaixar a temperatura em que a membrana plasmática passa pela fase de transição (GRAHAM & FOOTE, 1987; MOORE *et al.*, 2005). Desta forma, a membrana plasmática, que recobre os espermatozoides em toda sua totalidade, permanece fluida em menores temperaturas, evitando que os domínios em fase de gel possam alterar a permeabilidade da mesma e comprometer a viabilidade da célula.

2.6. A ciclodextrina e o colesterol

A ciclodextrina é um oligossacarídeo cíclico derivado da degradação do amido, com unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas. A ciclodextrina pode ser composta por 6 (α -ciclodextrina), 7 (β -ciclodextrina) e 8 (γ -ciclodextrina) unidades de D-glicose (OHVO e SLOTTE, 1996).

A ciclodextrina é considerada um composto anfipático, por possuir a face externa com natureza hidrofílica e a parte interna de natureza hidrofóbica. Assim, esta molécula tem relativa facilidade em encapsular substâncias apolares em

seu interior, facilitando seu transporte nos meios com polaridade diferente (DOBZIUK, 2006). Porém, deve-se levar em consideração a natureza da substância a ser encapsulada, que exerce influência no sucesso do encapsulamento (HÄRTEL *et al.*, 1998). Além dos benefícios ao congelamento de sêmen de diferentes espécies, a utilização de ciclodextrinas pode ser destinada à incorporação a outras substâncias, como hormônios, vitaminas e outros compostos de natureza lipídica (CHALLA *et al.*, 2005).

De acordo com Yancey *et al.* (1996), a β -ciclodextrina apresenta maior afinidade para os esteróis, principalmente o colesterol. Devido à alta afinidade pelos esteróis e seu pequeno diâmetro (15 Å), a ciclodextrina é capaz de retirar ou fornecer colesterol à membrana nos mais diversos domínios desta. Além disso, seu reduzido tamanho facilita sua difusão pelo diluidor. (YANCEY *et al.*, 1996). Além disso, modificações na estrutura das ciclodextrinas podem ser feitas para aumentar sua solubilidade em água e aumentar a eficácia de solubilização de substâncias em seu interior.

Christian *et al.* (1997), afirmaram que a metilação da β -ciclodextrina promove a prevenção da precipitação do colesterol após a diluição e aumenta a capacidade desta molécula em carregar o colesterol, em relação aos outros tipos de ciclodextrina.

Diversos estudos concluíram que a incorporação de colesterol, via ciclodextrina, ao sêmen de diferentes espécies preservava as características seminais de motilidade total e progressiva (%), vigor (0 – 5) e integridade das membranas plasmática e acrossomal (COMBES, 2000; KIRK, 2001; ZAHN, 2002; AWAD, 2002; PURDY & GRAHAM, 2004).

Os efeitos benéficos da incorporação do colesterol ao sêmen, podem estar relacionados a uma maior estabilização da membrana plasmática durante o processo de criopreservação, proporcionando menores danos devido à crioinjúria. Purdy e Graham (2004) determinaram, através de uma molécula fluorescente, o local de incorporação do colesterol à membrana. Diante dos resultados, foi possível concluir que o colesterol é incorporado ao longo de toda a membrana plasmática que recobre os espermatozoides, com maior concentração nas regiões acrossomal e mitocondrial. No entanto, a quantidade

de colesterol enviado à membrana plasmática das células é dependente da concentração de CCC a ser utilizada. Concentrações adequadas de CCC podem aumentar de 3 – 4 vezes o conteúdo de colesterol da membrana plasmática (HÄRTEL *et al.*, 1998).

Oliveira (2010) estudou a incubação de diferentes concentrações de ciclodextrina carregadas com colesterol (CCC) - 0, 1, 2 e 3 mg - para posterior adição ao sêmen fresco de jumentos da raça Pêga, que seriam destinados ao congelamento. As concentrações de 1, 2 e 3 mg de CCC a cada 120×10^6 espermatozoides apresentaram melhores resultados para viabilidade espermática pós-descongelamento. Já Alvaréz *et al.* (2006), concluiu que a melhor concentração de CCC para o sêmen de jumentos é de 2 mg de CCC/ 120×10^6 espermatozoides. Em contraste, a concentração de CCC utilizada para a maioria das espécies é de 1,5 mg de CCC/ 120×10^6 espermatozoides (PURDY & GRAHAM, 2004; MOORE *et al.*, 2005; MOCÉ & GRAHAM, 2006; PURDY *et al.*, 2010).

Purdy e Graham (2004) avaliaram a influência da temperatura da incubação na eficiência da complexação entre a ciclodextrina e o colesterol. Não foram observadas diferenças entre a faixa de temperatura entre 22 – 37° C. Alvaréz *et al.* (2006), determinou que a temperatura ótima para preparação do complexo ciclodextrina-colesterol era de 20° C.

É válido ressaltar que a incubação da CCC com o sêmen deve ser realizada em meio livre de gema de ovo ou leite desnatado, uma vez que os componentes dessas substâncias podem interferir no envio do colesterol à membrana plasmática (COMBES *et al.*, 2000; PURDY & GRAHAM, 2004).

2.7. Avaliação espermática

2.7.1. CASA – Computer Assisted Sperm Analyser

O desenvolvimento, ao longo de mais de quatro décadas, de aparelhos e softwares capazes de realizar análises computadorizadas do sêmen permitiu o acesso a inúmeras informações acerca das características inerentes à cinética espermática de espermatozoides individuais ou sub-populações de

espermatozoides. Com isso, a andrologia se tornou mais sofisticada, e foi possível entender diversas manifestações que culminavam na infertilidade do gameta masculino, seja de humanos ou animais.

A técnica, basicamente, se baseia na percepção dos movimentos realizados pela cabeça dos espermatozoides, embora sejam os flagelos os motores propulsores das células (AMANN e KARTZ, 2004). Diversas imagens da célula espermática são captadas e depois unidas, formando a trajetória a ser analisada.

Embora a avaliação subjetiva da motilidade espermática seja um método de fácil acesso e menor custo, não nos permite fazer inferências mais detalhadas sobre o movimento espermático, além de ser uma análise de resultados facilmente variáveis entre laboratórios (JØRGENSEN *et al.*, 1997). A avaliação computadorizada do sêmen é capaz de revelar características peculiares da cinética espermática (AMANN e KARTZ, 2004) de espermatozoides individuais ou de definidas populações da amostra, o que a avaliação subjetiva realizada através da microscopia óptica tradicional não é capaz. Tornou-se possível prever com maior margem de segurança, embora que não completamente, o potencial fértil do sêmen estudado (ARRUDA, 2000; FONSECA, 1992; VERSTEGEN *et al.*, 2002; MATOS *et al.*, 2008), embora alguns estudos comprovem que a correlação entre os parâmetros fornecidos pelo CASA não são determinantes da fertilidade (SAMPER *et al.*; 1991; BAILEY *et al.*, 1994).

É válido salientar que toda tecnologia apresenta certa porcentagem de erros e, para que este viés seja reduzido, calibrações do *setup* do aparelho e do *software* necessitam ser realizados de acordo com as características inerentes aos espermatozoides das espécies a serem estudadas. Além disso, alguns diluidores utilizados para resfriamento ou congelamento do sêmen apresentam alta concentração de partículas suspensas, prejudicando a discriminação entre as partículas e células por parte do aparelho (MORTIMER, 1997).

Para que a técnica seja empregada de maneira satisfatória e para que forneça os dados corretamente, é importante uma padronização eficiente do aparelho. Estratégias como: a adequação do *setup* do aparelho de acordo com a espécie a ser estudada, corretas diluições ($5 - 50 \times 10^6$ de

espermatozoides/mL) e utilização de diluidores adequados, podem auxiliar o aparelho para seu perfeito funcionamento. Além disso, amostras com grandes concentrações de debris e partículas suspensas podem prejudicar a colheita, processamento e fornecimento de dados por parte do aparelho, ocasionando subestima dos parâmetros de motilidade das células viáveis (MORTIMER, 1997; RATES, 2015).

Embora seja uma técnica de maior valor agregado, é indicada para minimizar ou excluir as diferenças de avaliações entre laboratórios, uma vez que é automatizada e tem a interferência humana diminuída. Além disso, as análises podem ser realizadas em um menor tempo e com maior acurácia, por terem maior repetibilidade de técnicas (GARNER, 1997).

Após submeter a amostra ao CASA, este transmite informações acerca de inúmeras características do movimento espermático: motilidade total (MT, % de células exibindo movimentação), motilidade progressiva (MP, % de células exibindo movimentação progressiva), VAP ($\mu\text{m/s}$; velocidade de trajeto média dos espermatozoides), VSL ($\mu\text{m/s}$; velocidade progressiva entre dois pontos de trajeto dividido pelo tempo gasto para realizar o trajeto), VCL ($\mu\text{m/s}$; velocidade curvilínea, que representa a trajetória real dos espermatozoides), ALH (μm ; amplitude média de deslocamento lateral da cabeça dos espermatozoides), BCF (Hz; frequência de batimentos flagelares), STR (%; retilinearidade do percurso, obtida da média entre VSL/VAP) e LIN (%; linearidade, representada pela relação entre VSL/VCL).

Ainda não é consenso entre os pesquisadores qual das avaliações da cinética espermática fornecidas pelo CASA tem maior correlação com os índices *in vivo* de fertilidade, além de existir respostas variáveis entre as espécies.

2.7.2. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que, associada à avaliação convencional e rotineira do sêmen, nos proporciona prever com maior fidelidade o status bioquímico e metabólico do espermatozoide. A célula espermática é anatomicamente dividida em diversas áreas, cada uma com uma

função vital para manter e possibilitar a transferência do material genético ao óócito durante o processo de fertilização. Porém, as diversas biotécnicas a que o sêmen é submetido são reconhecidamente danosas a ele.

Os danos mais comuns aos espermatozoides durante a criopreservação são a perda da integridade das membranas plasmática e acrossomal, lipoperoxidação da membrana plasmática pela ação das espécies reativas de oxigênio, injúrias na peça intermediária, prejudicando o movimento espermático e morte celular. Todas estas crioinjúrias são capazes de alterar a capacidade fertilizante do espermatozoide, comprometendo os índices de fertilidade do rebanho.

A maior parte das avaliações de rotina se baseiam nas aferições de motilidade total e progressiva da amostra de sêmen. Diversos estudos confirmam que a motilidade total e progressiva dos espermatozoides fornecidas pelo CASA, não são altamente correlacionadas a fertilidade a campo na maioria das espécies (SAMPER *et al.*; 1991; BAILEY *et al.*, 1994). É um consenso entre os pesquisadores a afirmação de que a avaliação dos parâmetros de motilidade e outras análises associadas são mais acuradas na avaliação do sêmen, uma vez que no CASA são avaliadas até 200 células por análise e, na citometria de fluxo, é possível avaliar a partir de 10.000 células por análise.

A citometria de fluxo é composta por quatro principais sistemas: fluídico, óptico, eletrônico e o software. As células em suspensão são carregadas pelo aparelho em velocidade compatível com a do sistema fluídico. Durante o transporte, os feixes luminosos incidem sobre a amostra e, a fluorescência, absorvância e a dispersão luminosa que as células emitem são captadas e estão relacionadas ao fluoróforo ou sonda em que foram incubadas. Quando são utilizadas associações entre sondas, o citômetro de fluxo é capaz de captar diferentes informações de uma mesma célula, melhorando a interpretação dos eventos fornecidos. Além disso, é possível adquirir informações sobre uma subpopulação espermática, diminuindo a heterogeneidade da amostra.

A citometria de fluxo, embora de alto valor agregado, permite uma avaliação de alta objetividade, repetibilidade e com informações valiosas e confiáveis sobre a amostra avaliada. Inúmeras sondas e suas associações têm

sido estudadas com as finalidades de aperfeiçoar as análises realizadas pelo citômetro de fluxo e tornar esta técnica mais acessível aos diferentes laboratórios (CELEGHINI *et al.*, 2007).

2.7.2.1. Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal

A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide e exerce funções relativas a troca de substâncias entre a célula e o meio que o rodeia, interação com outras células, proteção aos espermatozoides, dentre outros. A manutenção da membrana plasmática íntegra é de enorme interesse na andrologia, uma vez que preservada esta estrutura, os espermatozoides estarão aptos a desenvolverem suas funções. As células espermáticas também apresentam a membrana acrossomal, que contém enzimas responsáveis por facilitar a interação entre espermatozoide e o gameta feminino.

De maneira geral, a integridade das membranas plasmática e acrossomal é um dos principais pré-requisitos para o sucesso da criopreservação. Lesões nestas estruturas podem levar à perda de função da célula, comprometendo a fertilidade. Neste sentido, várias pesquisas ao longo dos anos têm testado diferentes técnicas que viabilizam a manutenção da integridade da membrana plasmática e acrossomal (CELEGHINI *et al.*, 2007). Concomitantemente, as técnicas para detecção de possíveis lesões também têm se aperfeiçoado.

Dentre os fluorocromos utilizados para detecção da integridade das membranas acrossomal e plasmática, os mais utilizados são lecitinas de plantas (PNA – *Arachis hypogaea*; PSA – *Pisum sativum*) conjugadas com uma isotiocionato de fluoresceína (FITC) e associados ao iodeto de propídio (PI).

O iodeto de propídio é uma sonda impermeável à membrana plasmática e, quando esta se encontra lesionada, se liga ao DNA dos espermatozoides e emite fluorescência vermelha (MATYUS *et al.*, 1984).

A lecitina PSA é uma sonda incapaz de penetrar na membrana acrossomal íntegra e, quando conjugada à fluoresceína FITC, marca o acrossoma lesionado ou reagido de verde. A PSA tem afinidade pelos terminais

α -glicosil e α -manosil dos resíduos de glicoproteínas e se liga especificamente a moléculas de α -manose dispostas na matriz acrossomal (CELEGHINI *et al.*, 2007).

2.7.2.2. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são substâncias com ações fisiológicas para os espermatozoides, dependendo de suas concentrações intracelulares. O monitoramento de suas atividades permite prever o estado metabólico da célula em associação aos parâmetros no pós-descongelamento. Desta forma, é importante fazer a determinação da concentração destas substâncias nas células e as possíveis injúrias decorrentes.

Dentre as ações benéficas que as EROs podem desencadear nos espermatozoides, a capacitação é uma delas. Em pequenas concentrações, as EROs são capazes de desencadear as rotas de sinalização que resultam na capacitação dos espermatozoides. *In vivo*, este gatilho para o processo de capacitação é desejável, porém, *in vitro*, pode ser um dos responsáveis pela rápida deterioração dos espermatozoides contidos na amostra. Assim, a aplicação da citometria de fluxo na determinação das EROs se torna uma maneira prática e eficiente de avaliar os efeitos das EROs na criopreservação de sêmen (SILVA e GADELLA, 2006).

No mercado, existem diferentes tipos de sondas capazes de auxiliar o monitoramento da produção de EROs, como a DHE (Diidroetídio), CellROX Deep Red, DCFDA (Diacetato de diclorodihidrofluoresceína).

A DCFDA é uma sonda capaz de penetrar na célula e sofrer oxidação pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), emitindo fluorescência verde. (FREITAS, 2015).

A CellROX Deep Red é uma sonda capaz de detectar o radical hidroxila e o ânion superóxido (LANÇONI, 2015). Pode ser avaliada por meio da citometria de fluxo, espectrofotometria e microscopia de fluorescência, além da possibilidade de avaliação de amostras preservadas pelo formaldeído (BATISSACO, 2014).

O DHE é uma sonda permeável à membrana celular e sofre oxidação pelo ânion superóxido (O_2^-) quando entram em contato. O O_2^- parece ser uma das EROs mais produzidas pelos espermatozoides, embora o H_2O_2 seja o que mais causa citopatias nos espermatozoides equinos (BURNAUGH *et al.*, 2007).

2.7.2.3. Avaliação da peroxidação lipídica

A membrana plasmática dos espermatozoides contém alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, que se comunicam entre si e entre as proteínas para determinar as diversas funções celulares. São responsáveis pela fluidez de membrana, característica que deve ser mantida para que ocorra capacitação, reação acrossomal, ligação ao oócito e fecundação. Porém, a alta distribuição de ácidos graxos poli-insaturados ao longo da membrana a torna uma estrutura sensível à peroxidação lipídica, principalmente pelas EROs produzidas em maior quantidade.

A peroxidação lipídica, uma vez instalada, altera a fluidez de membrana e pode afetar os espermatozoides, reduzindo a motilidade, metabolismo espermático, DNA espermático e até a fusão ao oócito. Portanto, o acompanhamento e prevenção da peroxidação tem como objetivo a manutenção da função celular. Este evento pode ser determinado pela identificação dos produtos da peroxidação lipídica ou pela utilização de sondas fluorescentes. A identificação dos produtos apresenta alta especificidade, no entanto, é mais laboriosa. A utilização de sondas para detecção da peroxidação lipídica apresenta alta sensibilidade e pode ser empregada na citometria de fluxo.

A sonda BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno-3-undecanoico) vem sendo utilizada para determinação da peroxidação lipídica da membrana plasmática de células viáveis. É uma sonda que, quando oxidada pelas EROs na camada hidrofóbica da membrana plasmática, emite fluorescência verde e a intensidade dessa fluorescência demonstra o grau de peroxidação da membrana.

2.7.2.4. Avaliação da organização da bicamada lipídica

Conforme descrito no item 2.2., a membrana plasmática é subdividida em domínios de membrana, nos quais os fosfolipídios e proteínas se distribuem de acordo com as interações entre eles e seus constituintes. Durante a fase de transição da membrana, esses domínios são reorganizados e, dependendo do grau de injúria à arquitetura normal da estrutura, esta pode perder sua função ou ter a função alterada.

Os eventos semelhantes a capacitação podem ocorrer durante a criopreservação e são responsáveis por alterar o grau de organização da bicamada lipídica da membrana plasmática. A instabilidade da membrana aumenta proporcionalmente ao grau de desorganização da mesma. Portanto, a avaliação da organização da bicamada lipídica nos fornece informações acerca da intensidade de alteração causada pelo processo de criopreservação, além da identificação de processos semelhantes a capacitação (SILVA e GADELLA, 2006).

A mensuração da desordem lipídica da membrana pelo uso da Merocianina (M540) apresenta alta acurácia e sensibilidade. A M540 é um fluoróforo de natureza hidrofóbica, que se liga ao folheto externo da membrana plasmática quando este se encontra instável, como é o caso de espermatozoides com alterações semelhantes à capacitação. O uso da M540 pode, ainda, ser combinado com o YO-PRO (YP) para diferenciação entre células viáveis e não-viáveis (NEILD *et al.*, 2005).

2.7.2.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A mitocôndria é uma das organelas mais importantes das células espermáticas e se localiza na peça intermediária do flagelo dos espermatozoides (MORTIMER, 1997).

É responsável por fornecer a maior parte do ATP utilizado no metabolismo espermático e disfunções nesta estrutura podem estar relacionadas a maior ocorrência de senescência e morte do espermatozoide. Por apresentar alta atividade, a mitocôndria contribui em grande escala para a produção de espécies

reativas de oxigênio, substâncias que, em grandes concentrações podem lesar a célula. Neste sentido, a mitocôndria se configura como um indicador confiável sobre os danos gerados pela criopreservação aos espermatozoides (PENÃ *et al.*, 2016).

Dentre as sondas mais utilizadas para detecção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), podemos destacar a Rhodamina 123 (R123), o MitoTracker, e o 5,5',6,6'-tetra-cloro-1,1',3,3'-iodeto de carbocianato de tetraetilbenzimidazol (JC-1).

A R123 é uma sonda que se acumula na mitocôndria e emite fluorescência verde de acordo com a existência de potencial de membrana mitocondrial. A desvantagem é que esta sonda não fornece informações acerca do potencial de membrana, além de só corar as mitocôndrias funcionais (SILVA e GADELLA, 2006; CUNHA *et al.*, 2015).

O MitoTracker é uma sonda disponível em variadas fluorescências. Esta sonda tende a se acumular na mitocôndria e sofrer oxidação, emitindo a fluorescência. A oxidação só ocorre sob condições de bom funcionamento mitocondrial e, portanto, é capaz de segregar mitocôndrias funcionais daquelas já deterioradas (SILVA e GADELLA, 2006).

O JC-1 é uma sonda lipofílica que também se acumula na mitocôndria de acordo com seu potencial de membrana. Porém, esta sonda tem a vantagem de diferenciar as células com baixo $\Delta\Psi_m$ e com alto $\Delta\Psi_m$. Em espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial, o JC-1 forma monômeros e emite a fluorescência verde. Nos espermatozoides com alto $\Delta\Psi_m$, o JC-1 origina J-agregados e emite a fluorescência laranja (GRAVANCE *et al.*, 2001).

2.7.2.6. Avaliação da apoptose celular

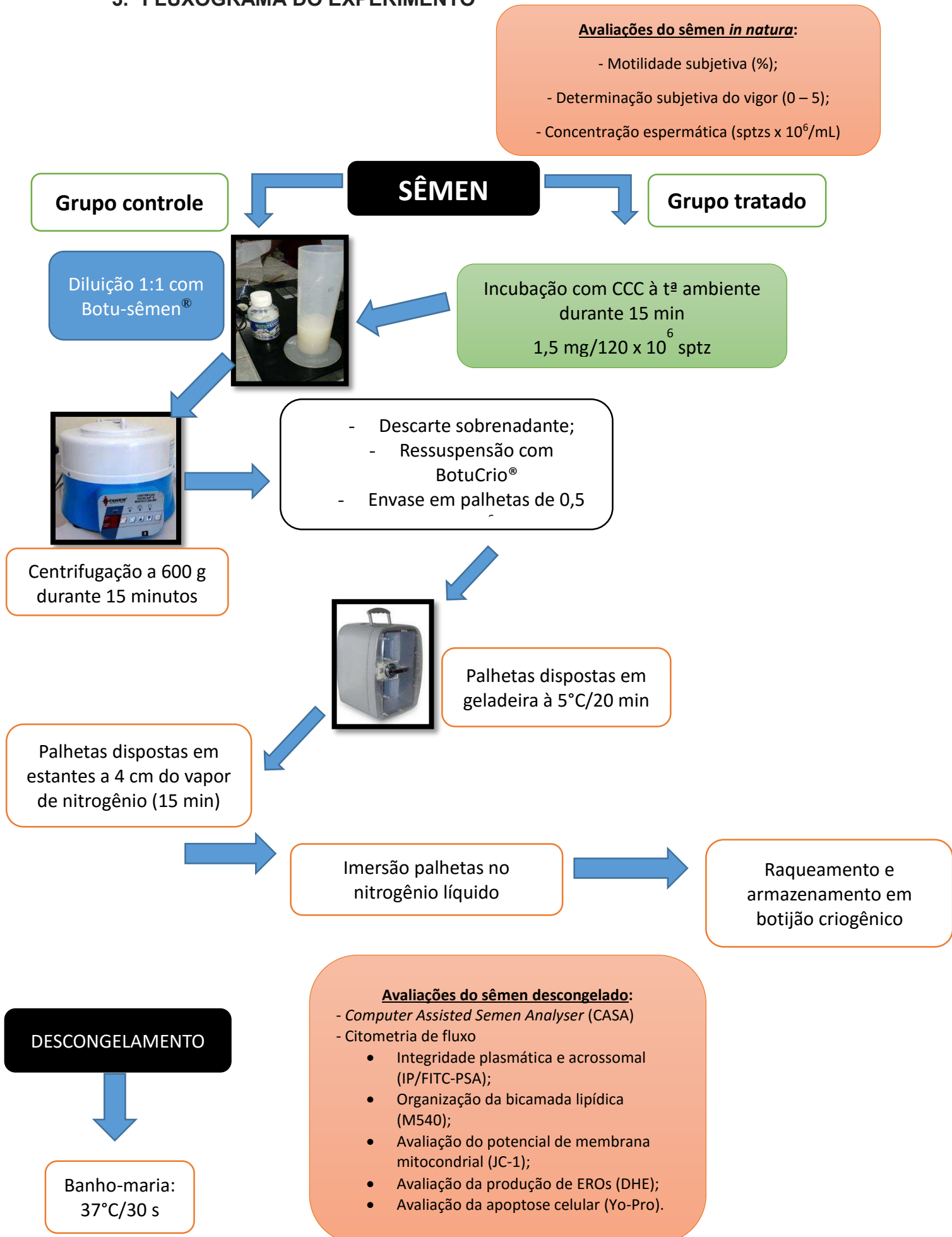
Processos como a criopreservação podem ocasionar a morte celular ou causar variados danos aos espermatozoides. Dentre eles podemos destacar as injúrias causadas à mitocôndria, organela responsável pela geração de energia para realização dos processos celulares e também envolvida na morte celular. É possível que o espermatozoide permaneça vivo após o processo de

criopreservação, porém, com algumas estruturas lesadas, o que poderia diminuir a vida útil da célula (ORTEGA-FERRUSOLA *et al.*, 2008).

As espécies reativas de oxigênio provenientes do metabolismo mitocondrial são uma das responsáveis por desencadear as rotas encarregadas da ativação de compostos pró-apoptóticos que culminam na morte celular. (RODRIGUEZ e SCHAPER, 2005; ORTEGA-FERRUSOLA *et al.*, 2008). Técnicas laboratoriais que sejam capazes de detectar células com características semelhantes à apoptose, nos permitem avaliar o grau de lesão causada pelo processo de criopreservação.

A utilização da sonda Yo-Pro tem sido aplicada para determinação da viabilidade celular. É uma sonda impermeável à membrana plasmática e é capaz de ser internalizada pelas células com aumento da permeabilidade, um dos eventos característicos da apoptose celular, que permite a entrada de substâncias antes não permeáveis. As vantagens da utilização desta sonda é que ela não apresenta toxicidade para a célula e não interage com os diversos compartimentos celulares de forma prejudicial (IDZIOREK *et al.*, 1995).

3. FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Foram utilizados 25 ejaculados de 5 jumentos hígidos da raça Pêga, com idade entre 3 e 10 anos, pertencentes ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, situado na cidade de Viçosa – MG, latitude 20°45'14" sul e longitude 42°52'55" oeste, e no Haras Tarumã, situado na cidade de Guaraciaba – MG, latitude 20°34'15" sul e longitude 43°00'28" oeste. Todos os animais foram considerados férteis, de acordo com exame andrológico prévio e histórico de utilização por monta natural.

Os ejaculados foram avaliados após a colheita e, aqueles com motilidade e vigor maiores que 70% e 3, respectivamente, prosseguiram no experimento.

Cada ejaculado foi dividido em duas alíquotas: uma parte do ejaculado foi congelado conforme modelo convencional (Controle) e a outra parte foi incorporada de colesterol e, após, submetida às etapas convencionais de congelamento (CCC).

Após o descongelamento, o sêmen foi reavaliado e submetido às diferentes técnicas de avaliação espermática.

4.2. Instalações e manejo dos animais

Durante o período experimental, os animais permaneceram alojados em baias de dimensões de 16 m², equipadas com cochos para alimentos (volumoso e concentrado), água e sal mineral. As baias eram voltadas para piquetes com capim Tifton e Coast cross (*Cynodon spp*). O arraçoamento foi realizado em dois momentos durante o dia, sendo fornecido capim elefante (*Pennisetum purpureum cv Cameroon* e *cv Napier*) picado no cocho e concentrado que atende às exigências do NRC (2007). Água de boa qualidade e sal mineral foram fornecidos *ad libitum*. O manejo sanitário (vacinas e controle parasitológico) foi realizado de acordo com o manejo das propriedades.

4.3. Processamento da ciclodextrina para incorporação do colesterol

A metil- β -ciclodextrina foi preparada de acordo com o preconizado por Purdy e Graham (2004). Em um tubo, 1 g de metil- β -ciclodextrina foi dissolvido em 2 mL de metanol. Em outro tubo, adicionou-se 200 mg de colesterol a 1 mL de clorofórmio. Uma alíquota de 0,45 mL dessa solução foi adicionada à solução de metil- β -ciclodextrina.

A solução foi misturada com auxílio de um vórtex até a clarificação da mesma e o conteúdo foi depositado sobre placa de petri. A remoção dos solventes foi realizada por evaporação, colocando a Placa de Petri sobre mesa aquecedora a 37 °C por 48 horas dentro de uma capela de fluxo laminar. Após este tempo, procedeu-se com a raspagem dos cristais resultantes e o armazenamento em temperatura ambiente até a sua utilização.

A solução de trabalho do complexo ciclodextrina-colesterol (CCC) foi preparada a partir da adição de 50 mg dos cristais em 1 mL de meio Tyrode modificado (TALP – Anexo A) e permaneceu incubada em Banho Maria a 37 °C até sua utilização no mesmo dia. Caso fosse utilizada posteriormente, a solução CCC+TALP permanecia sob temperatura de -20 °C até a sua utilização.

4.4. Colheita e avaliações imediatas do sêmen

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a colheitas de sêmen diárias, durante 5 dias, para esgotar as reservas extragonadais, seguidos de 2 dias de repouso sexual.

Os parâmetros seminais do sêmen fresco dos jumentos utilizados no presente estudo corroboram com os preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Neste manual, os valores mínimos de motilidade e vigor recomendados para o sêmen fresco é de 70 % e 3, respectivamente. Assim, os dados referentes às coletas dos jumentos estão de acordo com os parâmetros mínimos preconizados para realização dos congelamentos de sêmen.

A colheita total do sêmen foi realizada pelo método da vagina artificial modelo Botupharma® (Biotech, Botucatu, Brasil), com água aquecida a 50 °C. Para a colheita total do sêmen e para separação entre fração gel e o restante do ejaculado, foi utilizado o filtro de nylon (Minitube®) acoplado ao copo coletor durante a colheita de sêmen. As colheitas foram realizadas em dias alternados, com 48 horas de intervalo entre uma colheita e outra.

Após a colheita do sêmen, este foi destinado ao laboratório para aferição de diversos parâmetros seminais. O volume seminal sem gel foi avaliado com o auxílio de proveta graduada de 300 mL.

A motilidade total, motilidade progressiva e vigor foram determinadas através da deposição de uma alíquota de 10 µL de sêmen em lâminas de vidro pré-aquecidas a 37 °C e avaliadas ao microscópio óptico, com aumentos de 100 e 400 vezes. As avaliações de motilidade e vigor do sêmen fresco foram feitas pelo sistema de “duplo cego” por profissionais experientes.

A concentração espermática foi obtida com o auxílio da câmara de Neubauer através da diluição de ejaculados com aspecto aquoso ou opalescente na proporção de 1:20 em água destilada (50 µL sêmen em 950 µL de água destilada) e de aspecto opalescente e leitoso na proporção de 1:100 (10 µL de sêmen em 990 µL de água destilada).

4.5. Congelamento de sêmen

O sêmen fresco destinado ao congelamento convencional (Controle) foi diluído em meio comercial Botu-sêmen (Botupharma®, Botucatu, Brasil) na proporção 1:1. Os tubos foram centrifugados a 600 g durante 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pélete formado foi re-suspendido com 2 mL de diluente de congelação BotuCrio (Botupharma®, Botucatu, Brasil). Procedeu-se com a determinação da concentração espermática do pélete e adicionou-se quantidade suficiente de diluidor para obtenção de concentração final de 200 milhões de espermatozóides/ mL.

O sêmen foi envasado em palhetas francesas de 0,5 mL e lacradas com álcool polivinílico. Foram, então, distribuídas em geladeira de resfriamento à 5

°C, durante 20 minutos. Após o resfriamento, as palhetas foram distribuídas sobre rampa flutuante de 4 cm de altura e mantidas no vapor de nitrogênio por 15 minutos. Em seguida, foram mergulhadas no vapor de nitrogênio líquido, raqueadas e então armazenadas em botijão criogênico.

O sêmen destinado à incorporação de colesterol foi diluído em meio STALP (MOORE *et al*, 2005), para obtenção de concentração de 120 milhões de espermatozoides/mL, em um tubo Falcon de 50 mL. Ao tubo foi adicionado 1,5 mg de CCC/120 x 10⁶ espermatozoides. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos, ao abrigo de luz.

Após esse tempo, distribuiu-se o sêmen diluído em meio TALP em 6 tubos Falcon de 15 mL, procedeu-se com a re-diluição em BotuSêmen (Botupharma[®], Botucatu, Brasil) na proporção 1:1 e centrifugou-se os tubos a 600 g durante 15 minutos. A utilização do diluidor comercial a base de leite em pó tem intuito de proteger as células espermáticas dos efeitos deletérios da centrifugação.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pélete formado foi re-suspendido com 2 mL de diluente BotuCrio (Botupharma[®], Botucatu, Brasil). O conteúdo dos seis tubos foi reunido em um único tubo para determinação da concentração espermática e adicionou-se quantidade suficiente de diluidor para obtenção de concentração final de 200 milhões de espermatozoides/mL. O sêmen foi envasado em palhetas francesas de 0,5 mL, que foram resfriadas colocando-as em uma geladeira de resfriamento durante 20 minutos. Após o resfriamento, as palhetas foram distribuídas sobre rampa flutuante de 4 cm de altura e mantidas no vapor de nitrogênio por 15 minutos. Em seguida, foram mergulhadas no vapor de nitrogênio líquido e então armazenadas em botijão criogênico para análises posteriores.

4.6. Descongelamento do sêmen

As palhetas foram descongeladas em banho-maria, a 37 °C por 30 segundos, e o conteúdo das palhetas foi depositado em tubo plástico Eppendorf[®] de 1,5 mL. Em seguida, procedeu-se com a avaliação dos parâmetros seminais pós-descongelamento e aplicação de diversos testes para aferição de viabilidade espermática.

4.7. Análise computadorizada da cinética espermática (CASA)

A avaliação seminal pós-descongelamento foi realizada no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES), pertencente a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

O estudo da cinética espermática foi realizado através do software Sperm Class Analyser (SCA – Microptic[®], Microptic S.L., Barcelona, Espanha)(*Setup* - Anexo D), através de múltiplas capturas de imagem por uma câmera acoplada a um microscópio de epifluorescência (Nikon[®], modelo Eclipse Ni-U 80i.) no LATES.

Para a realização das análises por meio do CASA, o conteúdo das palhetas foi diluído em meio TALP *sperm* (BAVISTER *et al.*, 1983) – Anexo C – para obtenção de concentração espermática final de $30 \times 10^6/\text{mL}$. Uma alíquota de 5 μL da amostra diluída foi disposta em câmara de Makler (Makler Counting Chamber[®], Lexington, KY, USA), previamente aquecida a 37 °C, sendo analisados três campos aleatoriamente por amostra. As características analisadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

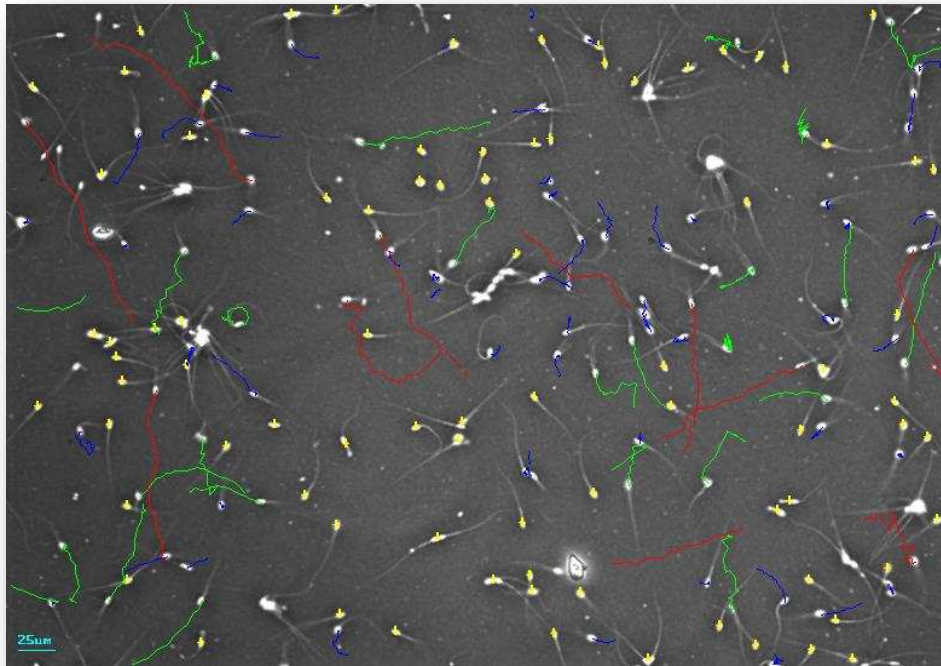


Figura 2 – Imagem da cinética espermática fornecida pelo *Sperm Class Analyser* (SCA - Microptic®, Microptic S.L., Barcelona, Espanha). Local:LATES-FMVZ/USP.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.8. Citometria de Fluxo

As análises por citometria de fluxo (Figura 2) foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, localizado no *campus* administrativo de Pirassununga, pertencente a Universidade de São Paulo.

As amostras de sêmen foram avaliadas no aparelho BDAccuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA), comandado pelo *software* BDAccuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA). Por análise foram avaliadas 10.000 células e estas foram interceptadas simultaneamente por um laser de argônio (azul – 488 nm de emissão) e por um laser UV (vermelho – 640 nm de emissão). A captura da fluorescência das sondas excitadas pelo laser de argônio foi feita pelos canais FL1 (Band pass-533/30 nm), FL2 (Band pass – 585/40 nm) e FL3

(Long pass > 670 nm) e a fluorescência das sondas excitadas pelo laser UV foi captada pelo canal FL4 (Band pass – 675/25). Os protocolos de incubação das diferentes sondas foram determinados pelo grupo de pesquisa responsável pelas análises.



Figura 3 – Aparelho BDAccuri C6 (Beckton-Dickeson, San Jose, USA) utilizado para análise das amostras por citometria de fluxo. Local: LMMD-FZEA/USP.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.8.1. Avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal (FITC-PSA/IP)

Para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal uma alíquota da amostra descongelada foi diluída em meio TALP *sperm* (BAVISTER *et al.*, 1983) em um tubo Eppendorf® (1,5 mL), para obtenção de concentração espermática final de 5×10^6 de espermatozoides/mL. Ao tubo Eppendorf® foi adicionado 1 μ L da sonda SYTO-59 (S10341, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), 1 μ L de Iodeto de Propídio (IP, L0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA) e 1 μ L de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA). A amostra e as sondas ficaram incubadas à

37 °C por 10 minutos e protegidas da luz. Passado este tempo, foram adicionados 150 µL de TALP *sperm* e prosseguiu-se com a leitura pelo aparelho de citometria de fluxo.

4.8.2. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (DHE/YP)

Para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular, uma alíquota da amostra descongelada foi diluída em meio TALP *sperm* (BAVISTER *et al*, 1983) em um tubo Eppendorf® (1,5 mL), para obtenção de concentração espermática final de 5×10^6 de espermatozoides/mL. Ao tubo pré-aquecido a 37 °C, foi adicionado 1 µL da sonda Dihidroetídio (DHE, D-23107, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e ambos foram submetidos à incubação durante 30 minutos à 37 °C. Decorridos 10 minutos da incubação, adicionou-se 1 µL da sonda Yo-Pro (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e, 10 minutos após, adicionou-se 1 µL de SYTO-59 ao tubo. Passado este tempo, foram adicionados 150 µL de TALP *sperm* e prosseguiu-se com a leitura pelo aparelho de citometria de fluxo.

4.8.3. Avaliação da peroxidação da membrana plasmática (C11-BODIPY^{581/591}/IP)

Para avaliação da peroxidação da membrana plasmática, uma alíquota da amostra descongelada foi diluída em meio TALP *sperm* (BAVISTER *et al*, 1983) em um tubo Eppendorf® (1,5 mL), para obtenção de concentração espermática final de 5×10^6 de espermatozoides/mL. Ao tubo pré-aquecido a 37 °C, foi adicionado 1 µL da sonda C11-BODIPY^{581/591} (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e permaneceram em incubação durante 30 minutos à 37° C. Passados os primeiros 20 minutos, adicionou-se 1 µL de SYTO-59 ao tubo e 1 µL de iodeto de propídio, e ficaram incubados à 37 °C nos 10 minutos restantes. Após este tempo, foram adicionados 150 µL de TALP *sperm* e prosseguiu-se com a leitura pelo aparelho de citometria de fluxo.

4.8.4. Avaliação da organização da bicamada lipídica (M540/YP)

Para avaliação da organização da bicamada lipídica, uma alíquota da amostra descongelada foi diluída em meio TALP *sperm* (BAVISTER *et al*, 1983) em um tubo Eppendorf® (1,5 mL), para obtenção de concentração espermática final de 5×10^6 de espermatozoides/mL. Ao tubo pré-aquecido a 37 °C, foi adicionado 1 µL da sonda Yo-Pro (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e ambos foram submetidos à incubação durante 10 minutos à 37° C. Passados os 10 minutos, adicionou-se 1 µL de SYTO-59 ao tubo. Uma nova incubação por 10 minutos à 37 °C foi realizada e, passado este tempo, adicionou-se 3 µL da sonda Merocianina 540 (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e, 70 segundos após, foram adicionados 150 µL de TALP *sperm* e prosseguiu-se com a leitura pelo aparelho de citometria de fluxo, no qual foram evidenciadas os espermatozoides viáveis (Yo-Pro negativo) com aumento na desorganização da bicamada lipídica (Merocianina 540 positivo).

4.8.5. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$; JC-1)

Para avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), uma alíquota da amostra descongelada foi diluída em meio TALP *sperm* (BAVISTER *et al*, 1983) em um tubo Eppendorf® (1,5 mL), para obtenção de concentração espermática final de 5×10^6 de espermatozoides/mL. Ao tubo Eppendorf® foi adicionado 1 µL da sonda JC-1 (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA), 1 µL da sonda SYTO-59 (S10341, Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA), e 1 µL de Iodeto de Propídio (IP, L0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, Missouri, EUA). A amostra e as sondas ficaram incubadas à 37 °C por 10 minutos e protegidas da luz. Passado este tempo, foram adicionados 150 µL de TALP *sperm* e prosseguiu-se com a leitura pelo aparelho de citometria de fluxo.

4.8.6. Avaliação da apoptose celular (Yo-Pro)

Para avaliação da organização apoptose celular, uma alíquota da amostra descongelada foi diluída em meio TALP *sperm* (BAVISTER *et al*, 1983) em um tubo Eppendorf® (1,5 mL), para obtenção de concentração espermática final de 5×10^6 de espermatozoides/mL. Ao tubo pré-aquecido a 37°C, foi adicionado 1 µL da sonda Yo-Pro (Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, EUA) e ambos foram submetidos à incubação durante 10 minutos à 37 °C. Passados os 10 minutos, adicionou-se 1 µL de SYTO-59 e 1 µL de PI ao tubo. Uma nova incubação por 10 minutos à 37 °C foi realizada e, passado este tempo foram adicionados 150 µL de TALP *sperm* e prosseguiu-se com a leitura pelo aparelho de citometria de fluxo, no qual foram evidenciados os espermatozoides com evidências de apoptose celular.

4.9. Análise estatística

O experimento *in vitro* foi delineado em blocos generalizados, sendo cada jumento considerado um bloco e $\frac{1}{2}$ do ejaculado a unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância (PROC MIXED), empregando-se o programa SAS (1998). O nível de significância considerado foi de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise computadorizada da cinética espermática (CASA)

Os valores médios referentes às características avaliadas no sêmen fresco dos 5 jumentos estão reunidos na Tabela 1.

Tabela 1. Médias \pm desvio-padrão das características avaliadas no sêmen fresco de jumentos da raça Pêga.

Jumento	Volume de sêmen sem gel (mL)	Concentração (espermatozoides $\times 10^6$ /mL)	Nº total de espermatozoides ($\times 10^9$)	Motilidade total (%)	Vigor (0 – 5)
J01	59,60 \pm 8,88	592 \pm 106,86	35270 \pm 8246,06	89 \pm 5,48	3,8 \pm 0,45
J02	39,60 \pm 5,18	510 \pm 62,95	20108 \pm 3025,90	83 \pm 2,74	3,4 \pm 0,55
J03	68,20 \pm 24,48	802 \pm 257,99	51694 \pm 16930,76	89 \pm 6,52	4,0 \pm 0,71
J04	62,40 \pm 18,89	445 \pm 172,48	26116 \pm 8588,37	84 \pm 6,52	3,6 \pm 0,55
J05	58,40 \pm 12,92	561 \pm 77,41	32492 \pm 7252,39	88 \pm 7,58	4,4 \pm 0,89
GERAL	57,64\pm14,07	582 \pm 135,54	33136 \pm 8808,70	86,6\pm5,77	3,84\pm0,63

As características avaliadas no sêmen fresco (volume sem gel, concentração espermática por mililitro e total, motilidade total e vigor) sofrem grandes variações entre jumentos, entre ejaculados de um mesmo jumento, entre estações do ano, entre raças, frequência de ejaculação, tipo de coleta, regime de monta, entre outros fatores (PICKETT *et al.*, 1970; GASTAL, 1991).

Canisso (2008), estudando os parâmetros seminais de seis jumentos da raça Pêga, através de 180 colheitas de sêmen, constatou que a média foi de 47,3 mL para o volume de sêmen sem gel, concentração espermática por mililitro de 254,64 $\times 10^6$ /mL, número de espermatozoides totais de 10,3 $\times 10^9$, 84,2% de motilidade total e vigor 3,9. São valores inferiores aos encontrados no presente estudo, mas que demonstram a variabilidade entre animais, entre coletas. Oliveira (2010) trabalhando com jumentos da raça Pêga, encontrou média para o volume de sêmen sem gel (42,2 mL), concentração espermática/mL (366,5 $\times 10^6$ /mL), número total de espermatozoides (14,0 $\times 10^9$) e motilidade total (83,0%) e vigor (3,9) inferiores aos encontrados no presente estudo.

Os valores médios \pm erro padrão das características de movimentação espermática estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias \pm desvio-padrão das características de cinética espermática do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga, fornecidas pelo programa *Sperm Class Analyser* (SCA).

PARÂMETROS	CONTROLE	TRATAMENTO	GERAL
MT (%)	29,92 ^a \pm 13,82	17,33 ^b \pm 7,18	23,89 \pm 12,73
MP (%)	12,44 ^a \pm 6,03	5,33 ^b \pm 2,69	9,03 \pm 5,90
VCL (μ M/S)	64,45 ^a \pm 9,65	46,16 ^b \pm 8,16	55,68 \pm 12,80
VSL (μ M/S)	43,50 ^a \pm 7,30	31,83 ^b \pm 6,73	37,90 \pm 9,11
VAP (μ M/S)	52,02 ^a \pm 8,17	38,76 ^b \pm 7,63	45,67 \pm 10,30
LIN (%)	67,60 \pm 6,40	68,74 \pm 7,75	68,14 \pm 7,03
STR (%)	83,55 \pm 4,06	81,91 \pm 5,07	82,76 \pm 4,59
ALH (μ M)	2,65 ^a \pm 0,48	1,63 ^b \pm 0,43	2,16 \pm 0,68
BCF (HZ)	7,67 ^a \pm 0,76	6,51 ^b \pm 1,76	7,12 \pm 1,45

Medias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si em nível de 5%.

Siglas: MT (%) – Motilidade total; MP (%) – Motilidade progressiva; VCL (μ m/s) – Velocidade curvilinear; VSL (μ m/s) – Velocidade progressiva; VAP (μ m/s) – Velocidade de trajeto; LIN (%) – Linearidade; STR (%) – Retilinearidade; ALH (μ m) – Amplitude de deslocamento lateral de cabeça; BCF (Hz) – Frequência de batimentos flagelares.

De acordo com a Tabela 2, os valores de motilidade total (MT) para o grupo controle (29,92%) se mostraram significativamente maiores ($p < 0,05$) que os valores encontrados para o grupo tratado (17,33%). Oliveira (2010), estudando diferentes concentrações de CCC para incubação ao sêmen, encontrou, entre as concentrações de 1 e 2 mg/120 x 10⁶ de espermatozoides, motilidades total variando entre 74,8% e 80,0%, valores superiores aos encontrados no presente estudo. Rates (2011), trabalhando com a incorporação de 1 mg de CCC/120 x 10⁶ de espermatozoides, encontrou motilidade total de 52,5%. Embora os resultados encontrados sejam inferiores comparados aos outros autores, os resultados de pós-descongelamento para o sêmen sem adição de CCC estão próximos ao limite estabelecido pelo CBRA (2013) para o sêmen de equídeos após a descongelação (30% de MT e vigor 3).

A motilidade progressiva (MP) do sêmen tratado com CCC também se mostrou inferior aos valores obtidos por Oliveira (2010), que encontrou 46,5% e 47,9% para os grupos tratados com 1 e 2 mg de CCC, respectivamente.

Em relação aos resultados encontrados, na Tabela 2, para a velocidade curvilinear (VCL, μ m/s), houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle (64,45) e o grupo tratado (46,16). Mortimer (1997) afirma que

espermatozoides que apresentam mudanças no movimento flagelar, principalmente nos valores referentes a VCL e ALH, são células com indícios de hiperativação. Considerando que a hiperativação é uma das características que evidenciam a capacitação espermática, é provável que a longevidade da célula espermática esteja comprometida. Porém, segundo Yanagimachi (1994), espermatozoides de equídeos são considerados hiperativados quando apresentam valores de $VCL \geq 180 \mu\text{m/s}$ e $ALH \geq 12 \mu\text{m}$, o que não pôde ser evidenciado nos dois grupos experimentais do presente estudo.

A velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) obtida foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre os grupos controle (43,50) e tratado (31,83). O grupo do sêmen tratado obteve pior índice de velocidade progressiva.

Os valores de linearidade (LIN, %) não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos estudados. Embora os valores absolutos das variáveis envolvidas (VSL/VCL) apresentem diferença numérica entre si, a relação entre uma e outra, de acordo com o grupo estudado, fornece proporções parecidas e, portanto, valores de LIN sem diferenças ($p > 0,05$). O mesmo acontece para os valores de retilinearidade (STR, %) entre os grupos controle e tratado ($p > 0,05$).

Os resultados obtidos referentes à característica de amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm) demonstram melhores resultados ($p < 0,05$) para o grupo tratado (1,63) em relação ao grupo controle (2,65).

Assim como para os valores de amplitude de deslocamento lateral de cabeça, os valores referentes à frequência de batimentos também diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre os grupos, tendo o grupo controle apresentado maior valor. Embora a maioria dos autores considere a frequência de batimentos como um parâmetro referente à cabeça do espermatozoide, a estrutura responsável pelos batimentos e deslocamento da célula espermática é o flagelo. Desta forma, uma maior frequência de batimentos pode estar relacionada a uma condição semelhante à hiperativação.

De acordo com Quintero-Moreno (2003), embora o CASA forneça grande número de parâmetros acerca da cinética espermática, não há uma determinação objetiva de quais valores poderiam explicar acuradamente o

movimento espermático. Mortimer (1997) acredita, ainda, que seja difícil eleger apenas uma característica da cinética espermática relacionada a bons índices de fertilidade *in vivo*. Jasko (1992) afirma, ainda, que avaliação individual de motilidade do sêmen não pode ser utilizada como parâmetro de grande acurácia para predizer a fertilidade, sendo o ideal a associação entre vários parâmetros.

5.2. Citometria de Fluxo

Os resultados referentes à avaliação simultânea das membranas plasmáticas e acrossomal se encontram representados na Tabela 3.

Tabela 3. Médias \pm desvio-padrão da porcentagem de categorias de células AIML, ARML, AIMI, ARMI do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Parâmetro	Controle	Tratamento
AIML	48,52 \pm 14,52	40,26 \pm 14,46
ARML	31,29 \pm 7,58	30,81 \pm 8,84
AIMI	12,73 ^a \pm 9,64	21,42 ^b \pm 12,94
ARMI	7,45 \pm 7,63	7,51 \pm 5,21

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si em nível de 5%.

Siglas: AIML – Acrossoma íntegro e membrana plasmática lesada; ARML – Acrossoma lesionado e membrana plasmática lesada; AIMI – Acrossoma íntegro e membrana plasmática íntegra; ARMI – Acrossoma lesionado e membrana plasmática íntegra.

De acordo com os resultados apresentados, não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) para a variável AIML (acrossoma íntegro e membrana plasmática lesada).

Para as variáveis ARML (acrossoma reagido e membrana plasmática lesada) e ARMI (acrossoma reagido e membrana plasmática íntegra) também não houve diferença ($p > 0,05$) entre o grupo controle e o grupo tratado.

Porém, para a variável AIMI (acrossoma íntegro e membrana plasmática íntegra) houve diferença ($p < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo tratado. A incorporação do colesterol ao sêmen tratado proporcionou melhores resultados frente a manutenção da integridade das membranas acrossomal e plasmática.

Em diferentes pesquisas realizadas com a incorporação de colesterol ao sêmen de touros e garanhões, Purdy e Graham (2004) e Moore *et al.* (2005)

obtiveram melhores resultados de viabilidade espermática e integridade de membranas nos grupos que receberam a adição de colesterol. A comparação entre as espécies poderia ser questionável, por existirem diferenças metabólicas, fisiológicas e estruturais. Porém, o intuito da comparação é de evidenciar que o tratamento do sêmen com colesterol pode ser benéfico de forma geral para as espécies.

No processo de criopreservação, normalmente os espermatozoides podem ser lesados devido à formação de gelo intra ou extracelular e pelos danos à membrana. A membrana plasmática passa por uma fase de transição, na qual passa do estado líquido para o estado cristalino. No estado cristalino ocorre uma reorganização dos constituintes da membrana, alterando suas funções e podendo comprometer a integridade e potencial fertilizante da célula. Desta forma, diferentes aditivos e crioprotetores têm sido propostos para diminuir o dano causado à membrana durante o processo de criopreservação.

A incorporação do colesterol ao sêmen de jumentos tem sido reportada por vários autores como uma boa forma de preservar o potencial fertilizante da célula. Embora os resultados *in vivo* ainda necessitem de maiores estudos, os resultados *in vitro* da adição do colesterol tem revelado uma maior preservação da célula durante o processo de criopreservação. A ação protetora do colesterol é decorrente da diminuição faixa de temperatura pela qual a membrana passa pela fase de transição. Assim, a membrana se mantém fluida em temperaturas mais baixas.

Além da ação de preservação pela diminuição da temperatura da fase de transição, o colesterol participa prevenindo a capacitação prematura dos espermatozoides. Durante o deslocamento do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea até o sítio de fertilização, a membrana plasmática tende a sofrer um efluxo de colesterol, com o intuito de diminuir a estabilidade da mesma e dar início a fase de capacitação. Porém, antes mesmo da deposição do gameta masculino no trato reprodutivo da fêmea, a membrana plasmática já apresenta uma diminuição da concentração de colesterol, devido ao processo de criopreservação. Eventos semelhantes à capacitação são reconhecidamente responsáveis por diminuir a vida útil do espermatozoide. Neste sentido, a

incorporação de colesterol, dentre outros, auxilia na manutenção de níveis adequados de colesterol na membrana.

Cerolini *et al* (2001) relataram que em cachacos, a perda de colesterol devido ao processo de criopreservação pode chegar em até 50% e seria uma das causas da capacitação precoce das células, que esgotariam suas reservas energéticas de forma mais rápida e sobreviveriam por menor tempo no trato reprodutivo das fêmeas.

Além dos danos causados pelo frio, a membrana plasmática também pode sofrer o estresse oxidativo, causado pelas espécies reativas de oxigênio, produtos normais do metabolismo da célula. Em baixos níveis, as EROs são responsáveis por algumas sinalizações celulares, porém quando estão exacerbadas no citoplasma, as EROs podem ser altamente prejudiciais para a manutenção do espermatozoide. As EROs podem prejudicar a composição proteica, lipídica e até de DNA do espermatozoide, portanto, o monitoramento da produção de EROs se torna marcadamente importante no processo de criopreservação.

A valores referentes à determinação da produção de espécies reativas de oxigênio se encontram representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Médias \pm desvio-padrão da porcentagem de categorias de células: DEAD (Espermatozoides mortos); LIVE-DHE+ (espermatozoides vivos com produção de espécies reativas de oxigênio); LIVE (espermatozoides vivos) do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Parâmetro	Controle	Tratamento
DEAD	81,23 ^a \pm 10,59	70,14 ^b \pm 11,23
LIVE-DHE+	2,10 ^a \pm 1,21	3,73 ^b \pm 1,64
LIVE	14,11 ^a \pm 7,71	24,54 ^b \pm 10,41

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si em nível de 5%.

Diante dos valores expostos é possível concluir que o grupo tratado diferiu em todas as características avaliadas ($p < 0,05$) do grupo controle.

A porcentagem de espermatozoides mortos (YP+) foi maior ($p < 0,05$) no grupo controle, fato que pode ser interpretado como uma maior susceptibilidade das células não tratadas ao processo de criopreservação.

A característica LIVE-DHE+ (espermatozoides vivos com produção de espécies reativas de oxigênio) apresentou maiores valores ($p < 0,05$) em relação ao grupo tratado. Em um primeiro momento seria esperado avaliar este resultado como uma pior capacidade do colesterol incorporado de prevenir a produção de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, devemos ressaltar que a maior produção de espécies reativas de oxigênio provém das células mais ativas metabolicamente e estruturalmente íntegras ($r = 0,56$). A afirmativa acima corrobora com os resultados encontrados para a porcentagem de espermatozoides vivos (LIVE) no grupo tratado, que foi próximo ao dobro ($p < 0,05$) da porcentagem de espermatozoides vivos provenientes do grupo controle.

Espermatozoides são altamente vulneráveis aos efeitos das EROs, uma vez que possuem alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática, além de baixa concentração de antioxidantes no citoplasma de espermatozoides criopreservados (BILODEAU *et al.*, 2000).

De forma contrária ao presente estudo, Murphy *et al.* (2014) trabalhando com a criopreservação de sêmen de garanhões, não encontraram diferenças quanto à produção de EROs para o grupo tratado com colesterol.

A mitocôndria, e mais especificamente, a cadeia de transporte de elétrons, são umas das principais responsáveis pela geração de EROs no espermatozoide e, portanto, a produção de EROs intracelular está relacionada ao *status* metabólico da célula ($r = 0,67$). Gibb *et al.* (2014) salientam que há correlação positiva entre a produção de EROs dos espermatozoides metabolicamente mais ativos e a fertilidade. Com o advento da citometria de fluxo e a descoberta de novos fluoróforos, foi possível detectar o potencial de membrana mitocondrial através da sonda JC-1 e, com isso, predizer quais células se encontram mais ativas.

Na Tabela 5 é possível comparar os grupos experimentais quanto à porcentagem de células com potencial de membrana alto e baixo.

Tabela 5 - Médias \pm desvio-padrão da porcentagem de categorias de células: LAHP (Espermatozoides vivos com alto potencial de membrana); ALP (Espermatozoides vivos com baixo potencial de membrana); DEAD (espermatozoides mortos) do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Parâmetro	Controle	Tratamento
AHP	6,30 ^a \pm 5,29	15,49 ^b \pm 12,36
ALP	38,91 ^a \pm 5,98	36,99 ^b \pm 4,10
DEAD	34,10 \pm 6,96	29,19 \pm 6,52

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si em nível de 5%.

A mitocôndria espermática apresenta importante função, que é a de prover aporte energético para que possam ocorrer os batimentos flagelares e a movimentação do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea. Assim, qualquer injúria nesta estrutura pode comprometer todo o processo que culmina na fertilização. A utilização da sonda JC-1 tem como principal objetivo verificar o comprometimento do aparato energético do espermatozoide.

O JC-1 é uma sonda lipofílica que emite fluorescência de acordo com a polaridade da mitocôndria. Em mitocôndrias com baixo potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$), o JC-1 forma monômeros que emitem fluorescência verde. Já nas mitocôndrias com potencial acima de 80-100 mV, o JC-1 tem o poder de formar multímeros conhecidos como J-agregados, que emitem a fluorescência laranja (GRAVANCE *et al.*, 2000).

De acordo com os resultados, supõe-se que a manutenção de maior integridade da membrana plasmática proveniente do papel estabilizador da incorporação de colesterol ao sêmen de jumentos, pode ter sido o responsável por promover a manutenção de um alto potencial de membrana nos espermatozoides do referido grupo ($p < 0,05$) em relação ao grupo que não recebeu o tratamento, evidenciado através da correlação ($r = 0,70$) entre integridade de membrana plasmática e a manutenção de um alto potencial mitocondrial.

O alto potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides do grupo tratado pode ser o responsável pela maior geração de EROs ($r = 0,67$), evidenciado na Tabela 4.

Embora haja correlação entre a produção de EROs e a fertilidade, estas espécies reativas podem ocasionar lesões no aparato contrátil do flagelo, podendo ser uma das causas da redução da motilidade espermática em alguns estudos (BAUMBER *et al.*, 2000; COCCHIA *et al.*, 2011; GUTHRIE *et al.*, 2012). Este fato poderia explicar os menores valores de motilidade total e progressiva do grupo tratado em relação ao grupo controle, expostos na Tabela 2.

Embora a produção de EROs no grupo tratado tenha sido maior ($p < 0,05$), a presença dessas substâncias não resultou em níveis de peroxidação diferentes ($p > 0,05$) entre o grupo tratado e o grupo controle. É possível visualizar nos dados da Tabela 6, que os valores apresentados de emissão de fluorescência através da incubação com a sonda C11-BODIPY^{581/591} não diferiu ($p > 0,05$) entre os grupos.

Tabela 6 - Medianas \pm desvio-padrão da peroxidação lipídica, medida em intensidade de fluorescência do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Parâmetro	Controle	Tratamento
Intensidade de fluorescência	669,81 \pm 337,87	743,42 \pm 417,26

Medianas seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si em nível de 5%.

A incidência de peroxidação dos lipídios de membrana assume marcada importância devido ao fato de a membrana plasmática do espermatozoide apresentar alta concentração de ácidos graxos insaturados. Como produtos naturais do metabolismo espermático, as EROs podem promover a peroxidação dos lipídios da membrana. Aitken *et al.* (1993) afirmam que a peroxidação lipídica pode levar à formação de intermediários reativos, que seriam responsáveis por propagar a peroxidação dentro da membrana, exacerbando o processo e causando maiores injúrias àquela estrutura.

Embora tenha se verificado diferenças ($p < 0,05$) na produção de EROs entre os grupos experimentais, não houve diferenças entre os grupos ($p > 0,05$) para os parâmetros de peroxidação lipídica da membrana plasmática. As hipóteses para tal fato se baseiam em insuficiência das EROs em causar a peroxidação dos lipídios da membrana dos espermatozoides avaliados e/ou o

fato de a peroxidação dos lipídios ter acontecido de maneira rápida a ponto de não ter sido possível detectar diferenças entre os grupos experimentais através da citometria de fluxo.

A criopreservação é responsável por favorecer a perda de constituintes pela membrana, favorecendo o aumento de fluidez e desorganização lipídica desta. De forma similar ao que acontece *in vivo*, a perda de constituintes pode levar ao estado de capacitação do espermatozoide, o que poderia reduzir a meia-vida celular e comprometer a fertilização do oócito. As células que conseguem permanecer em um estado não-capacitado após a criopreservação, podem apresentar maior longevidade e maior chance de alcançar o sítio de fertilização. Desta forma, técnicas que consigam detectar as mudanças semelhantes à capacitação nos espermatozoides, fornecem informações valiosas acerca dos danos causados pela criopreservação.

Para detecção da desorganização da membrana e viabilidade espermática, as amostras dos grupos experimentais foram incubadas com a sonda Merocianina 540 (M540) e Yo-Pro (YP), e os resultados estão discriminados na Tabela 7.

Tabela 7 - Médias \pm desvio-padrão das porcentagens de células nas três categorias: LIVE-CAP (células viáveis e capacitadas: YP-/M540+); LIVE (células viáveis não capacitadas: YP-/M540-); DEAD (células não viáveis e não capacitadas: YP+/M540-) do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Parâmetro	Controle	Tratamento
LIVE-CAP	2,71 \pm 2,01	3,54 \pm 2,35
LIVE	7,34 ^a \pm 4,82	17,07 ^b \pm 8,18
DEAD	88,00 ^a \pm 6,05	74,96 ^b \pm 9,59

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si em nível de 5%.

Não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos em relação a desorganização da membrana plasmática.

A merocianina (M540) é uma sonda capaz de detectar a desorganização precoce da camada externa da membrana plasmática, um dos primeiros processos que culminam na capacitação do espermatozoide (RATHI *et al.*, 2001). A desordem fosfolipídica permite a intercalação da M540 e, portanto,

quanto maior o grau de desorganização da membrana, maior a fluorescência emitida pela M540. Como os processos semelhantes à capacitação espermática conduz a uma desordem dos constituintes da membrana, pode-se supor que haverá maior emissão de fluorescência. Porém, no presente estudo não foi possível detectar diferenças entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) em relação às alterações semelhantes à capacitação.

Em relação aos parâmetros de apoptose celular, não houve diferença entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). No entanto, houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos em relação à viabilidade das células, possivelmente devido à maior integridade de membrana plasmática ($r = 0,70$) demonstrando melhores resultados para o grupo tratado. Os resultados se encontram expostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Médias \pm desvio-padrão das porcentagens de células viáveis (LIVE), células não viáveis (DEAD) e apoptóticas (APOPPTO) do sêmen descongelado de jumentos da raça Pêga.

Parâmetro	Controle	Tratamento
LIVE	12,69 ^a \pm 8,84	23,67 ^b \pm 12,46
DEAD	62,94 ^a \pm 12,25	52,04 ^b \pm 14,06
APOPPTO	23,28 \pm 9,81	22,08 \pm 12,25

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si em nível de 5%.

5.3. Conclusões

- A incorporação de colesterol ao sêmen de jumentos da raça Pêga não foi capaz de preservar os parâmetros de motilidade total e progressiva após o descongelamento da amostra;
- A incorporação de colesterol ao sêmen de jumentos da raça Pêga foi eficaz em preservar as membranas acrossomal e plasmática íntegras;
- A incorporação de colesterol ao sêmen de jumentos da raça Pêga preserva o potencial de membrana mitocondrial após o descongelamento, demonstrando que o colesterol proporcionou efeito protetivo às membranas das mitocôndrias;
- A incorporação de colesterol ao sêmen de jumentos da raça Pêga foi capaz de manter um maior número de células viáveis após a criopreservação.

6. Referências bibliográficas

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p.459-469. 1987.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.97, p.441-450. 1993.

AITKEN, R. J.; JONES, K. T.; ROBERTSON, S. A. Reactive oxygen species and sperm function – In Sickness and in health. *Journal of Andrology*, v.33, n.6, p.1096-1106. 2012.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; KEITH, R.; WALTER, P. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. In: **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, Cap. 10, p.583-595, 2004.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F.O. Principais avanços no processamento e aplicação do sêmen congelado de equinos. **Asociación Peruana de Reproducción Animal**, v.1, p. 7-10. 2011.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F.O; NETO, C. R. Advances in Stallion Semen Cryopreservation. **Veterinary Clinics of NA: Equine Practice**, v. 32, p.521-530. 2016.

ALVARÉZ, A. L.; SERRES, C.; TORRES, P.; CRESPO, F.; MATEOS, E.; GÓMEZ-CUÉTARA, C. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.89-91. 2006.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function, In:McKinnon A.O.; Voss, J. L. (Ed). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745. 1992.

AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. **Biology of Reproduction**, v.23, p.647-656. 1980.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. Principles of Cryopreservation and Review of Cryopreservation of Stallion Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173. 1987.

AMANN, R. P. Tests to measure the quality of spermatozoa at spermiation. **Asian Journal of Andrology**, v.12, p. 71-78. 2010.

AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v.81, p. 5-17. 2014.

AMORIM, E. A. M. Alterações na membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen. Tese (Doutorado em Zootecnia), 2008, xf. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008a.

- AMORIM, E. A. M.; GRAHAM, J. K.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M; TORRES, C. A. A. Cryobiology Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v.58, p. 210-214. 2008b.
- ANDERSON, C. R. **The influence of cholesterol loading and subsequent unloading in preservation of stallion spermatozoa**. Thesis (Master of Science), 2005, 59p. The University of Ariona, EUA, 2005.
- ANDRADE, A. F. C.; **Efeito da adição do plasma seminal nas mudanças semelhantes à capacitação (Criocapacitação) em espermatozóides criopreservados de equinos**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), 2009, 133f. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2009.
- ARGOV-ARGAMAN, N.; MAHGREFTHE, K.; ZERON, Y.; ROTH, Z. Variation in lipid profiles within semen compartments - the bovine model of aging. **Theriogenology**, v.80, p.712-721.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. Tese (Livre Docência em Reprodução Animal), 120f, 2000. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2000.
- ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Sci Vet Supl**, v.31, p.226-227. 2003.
- ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.8-16. 2007.
- 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. 2000.
- BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069. 2001.
- BALL, B. A.; VO, A. Detection of Lipid Peroxidation in Equine Spermatozoa Based Upon the Lipophilic Fluorescent Dye C11-BODIPY^{581/591}. **Journal of Andrology**, v.23, p.259-269. 2002.
- 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.
- BATELLIER, F.; VIDAMENT, M. FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J. M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p.181-190. 2001.

BATISSACO, L. **Criopreservação do sêmen ovino com incorporação de colesterol por ciclodextrina**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), 113f., 2014. Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2014.

BATTUT, J. B.; KEMPFER, A.; BECKER, J.; LEBAILLY, L.; CAMUGLI, S.; CHEVRIER, L. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. **Theriogenology**, v.86, p.1111-1131. 2016.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V. DAVIES-MORELL, M. C. G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, n.6, p.895-902. 2000.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1025-1033. 2002.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, p. 621-628. 2003a.

BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B. A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 60, p. 1239–1247. 2003b.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, p.772-779. 2005.

BAVISTER, D.; LORRAINE, M. Development of reimplantation in a defined embryos of the Golden culture medium. **Biological Trace Element Research**, v.28, p.235-247. 1983.

BENSON, James D. et al. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682-1699, 2012.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de análise de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, p.189-194. 2014.

BILODEAU, J-F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M-A.; GAGNON, C. Levels of antioxidante defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.282-288. 2000.

BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Response of Boar Sperm to the Treatment with Cholesterol-Loaded Cyclodextrins Added Prior to Cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.959-964. 2012.

BLOMMAERT, D.; FRANCK, T.; DONNAY, I.; LEJEUNE, J.P.; DETILLEUX, J.; SERTEYN, D. Substitution of egg yolk by a cyclodextrin-cholesterol complex allows a reduction of the glycerol concentration into the freezing medium of equine sperm. **Cryobiology**, v.72, p.27-32. 2016.

- BOLAÑOS, J. M. G.; MORÁN, A. M.; SILVA, C. M. B.; RODRIGUÉZ, A. M.; DÁVILA, M. P.; APARICIO, I. M.; TAPIA, J. A.; FERRUSOLA, C. O.; PEÑA, F. J. Autophagy and Apoptosis Have a Role in the Survival or Death of Stallion Spermatozoa during Conservation in Refrigeration. **Plos One**, v. 7, p.1-9. 2012.
- BORYSHPOLETS, S.; KOWALSKI, R. K.; DIETRICH, G. J.; DZYUBA, B.; CIERESZKO, A. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. **Theriogenology**, v.80, p.758-765. 2013.
- BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BAUER, J. E.; MACPHERSON, M. L.; VARNER, D. D. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.65-71. 2007.
- BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v.67, p.580-589. 2007.
- CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; CARVALHO, G. R.; GUIMARÃES, J. D.; SILVA, E. C.; LIMA, A. L. Alguns aspectos fundamentais do exame clínico andrológico de jumentos (*Equus asinus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.233-239. 2008.
- CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; KER, P. G.; RODRIGUES, A. L.; SENA, T. C.; CARVALHO, G. R. Coleta de sêmen de jumentos (*Equus asinus*) utilizando-se éguas em estro como manequim. **Ciências veterinárias dos trópicos**, v.11, p.57-64. 2008.
- CANISSO, I. F. **Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), 2008, 211f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; ESCOBAR, J. M. O.; CARVALHO, G. R.; MOREL, M. C. D.; SILVA, E. C.; GUIMARÃES, J. D.; LIMA, A. L. Congelamiento de semen de burro (*Equus asinus*). **Rev Inv Vet Peru**, v.19, p.113-125. 2008.
- CANISSO, I. F.; CARVALHO, G. R.; DAVIES MOREL, M. C. G. Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga Donkeys (*Equus asinus*) mounting estrous horse mares (*Equus caballus*). **Theriogenology**, v.73, p.56-63. 2010.
- CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; LEMES, A. P.; MOURÃO, G. B.; DODE, M. A. N. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.44, p.1346-1351. 2009.
- CARVALHO, L. E. **Características físicas e fecundidade do sêmen de jumentos coletado de forma fracionada e preservado resfriado a 5°C**. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária), 2011, 357f. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2011.
- CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186

f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 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 in Domestic Animals**, v.488, p.479-488. 2007.

CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J. S.; ARRUDA, R. P. Damage Assessment of the Equine Sperm Membranes by Fluorimetric Technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p.1285-1292. 2010.

CEROLINI, S; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T. M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v.121, p.395-401. 2001.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J. Cyclodextrins in drug delivery: an update review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v.6, n.2, artigo n.43. 2005.

CHUAYCHU-NOO, N.; THANANURAK, P.; CHANKITISAKUL, V.; VONGPRALUB, T. Cryobiology Supplementing rooster sperm with Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. **Cryobiology**, v.74, p.8-12. 2017.

CHRISTIAN, A. E.; HAYNES, M. P.; PHILLIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. **Journal of Lipid Research**, v.38, p.2264-2272. 1997.

COCCHIA, N.; PASOLINI, M. P.; MANCINI, R.; PETRAZZUOLO, O. CRISTOFARO, I.; ROSAPANE, I.; SICA, A.; TORTORA, G.; LORIZIO, R.; PARAGGIO, G.; MANCINI, A. Effect of SOD (superoxido dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracelular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, p.1201-1210. 2011.

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

COMBES, G. B.; VARNER, D. D.; SCHROEDER, F.; BURGHARDT, R. C.; BLANCHARD, T. L. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 127-132. 2000.

CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.74, p.424-435. 2010.

CORREIA, M. G. **Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática do Espermatozóide em Sêmen Congelado de Cavalos da Raça Lusitana**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 2015, 69 f. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro Avaliação, Vila Real, 2015.

CRICHTON, E. G.; PUKAZHENTHI, B. S.; BILLAH, M.; SKIDMORE, J. A. Cholesterol addition aids the cryopreservation of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) spermatozoa. **Theriogenology**, v.83, p.168-174. 2015.

CROSS, N. L. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. **Biology of Reproduction**, v.59, p.7-11. 1998.

CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; DODE, M. A. N. Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, n.6, suplemento 2, p.4365-4376. 2015.

DARIN-BENNETT, A., WHITE, I. G., Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v. 14, p. 466-470. 1977.

DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A.; WHITE, I. G. The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.26, p.1409-1420. 2006.

DAVIS, B. K. Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol / phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.78, p.7560-7564. 1981.

DE GRAAF, S.P.; EVANS, G.; GILLAN, L.; GUERRA, M. M. P.; MAXWELL, W. M. C.; O'BRIEN, J. K. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.67, p.217-227. 2007.

DE LEEUW, F. E.; CHEN, H. C.; COLENBRANER, B.; VERKLEIJ, A. J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v.27, p.171-183. 1990.

DOBZIUK, H. Molecules with holes – cyclodextrins. In: DODZIUK, H. (ed.), *Cyclodextrins and Their Complexes*. **Chemistry, Analytical Methods, Applications**, Weinheim: Wiley, p 1-30. 2006.

DROBNIS, E. Z.; CROWE, L. M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T. J.; OVERSTREET, J. W.; CROWE, J. H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 432-437. 1993.

FLORES, E.; TABERNER, E.; RIVERA, M. M.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; MIRÓ, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Effects of freezing / thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. **Theriogenology**, v.70, p.936-945. 2008.

FONSECA, V.O. da; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. de. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 79p. 1992.

FORD, W. C. L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v.10, p.387-399. 2004.

FOSTER, M L.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; BRINSKO, S. P.; HINRICHS, K.; TEAGUE, S.; LACAZE, K.; BLANCHARD, T. L. Comparison of methods for

assessing integrity of equine sperm membranes. **Theriogenology**, v.76, p.334-341. 2011.

FREITAS, B. W.; GUIMARÃES, J. D.; SILVEIRA, C. O.; BEZERRA, L. L.; MAITAN, P. P. Uso de colesterol carregado por ciclodextrina na criopreservação de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.4, p.225-229. 2014.

FREITAS, B. W. **Efeito de diferentes crioprotetores e aditivos no diluente sobre a qualidade seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), 2015, 116 f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2015.

GADELLA, B. M.; LOPES-CARDOZO, M.; VAN GOLDE, L. M. G.; COLENBRANDER, B.; GADELLA JR, T. W. J. Glycolipid migration from the apical to the equatorial subdomains of the sperm head plasma membrane precedes the acrosome reaction. **Journal of Cell Science**, v.108, p.935-945. 1995.

GADELLA, B. M.; LUNA, C. Cell Biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. **Theriogenology**, v.81, p.74-84. 2014.

GAGNON, C. Regulation of sperm motility at the axonemal level. **Reprod Fertil Dev**, v.7, p.847-855. 1995.

GARCIA, B. M.; MORAN, M. A.; FERNANDEZ, L. G.; FERRUSOLA, C. O.; RODRIGUEZ, A. M.; BOLAÑOS, J. M. G.; SILVA, C. M. B.; MARTINEZ, H. R.; 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 N-terminal Kinase (JNK) Pathway. **Journal of Andrology**, v.33, p. 105-113. 2012.

GARNER, D.L. Ancillary tests of bull semen quality. **Veterinary Clinics of North America**, v.13, p.313-327, 1997.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A. Organelle-Specific Probe JC-1 Identifies Membrane Potential Differences in the Mitochondrial Function of Bovine Sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.53, p.222-229. 1999.

GASTAL, M. M. F. O. **Estudo das características seminais e do comportamento sexual de jumentos**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 105 f, 1991. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1991.

GLAZAR, A. J.; 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.

GIARETTA, E.; MUNERATO, M.; YESTE, M.; GALEATI, G.; SPINACI, M.; TAMANINI, C.; MARI, G.; BUCCI, D. Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. **Animal Reproduction Science**, v.176, p.11-19. 2017.

- GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; AITKEN, R. J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v.91, p.1-10. 2014.
- GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445-457. 2005.
- GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Criobiology**, v.52, p.42-45. 1987.
- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147. 1996.
- GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247. 2001.
- GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; BAUMBER, J.; BALL, B. A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v.53, p.1691-1703. 2000.
- GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; MILLER, M. G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, v.15, 5-10. 2001.
- GÜRLER, H.; MALAMA, E.; HEPPELMANN, M.; CALISICI, O.; LEIDING, C.; KASTELIC, J. P.; BOLLWEIN, H. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. **Theriogenology**, v.86, p.562-571. 2016.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700-1708. 2012.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. In: **Reprodução Animal**. 7 ed. Barueri: Manole. 2004.
- HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, Ü.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/ Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v.65, p.1122-1136. 2006.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. **Journal of Andrology**, v.11, p.73-88. 1990.
- HARRISON, R. A.; ASHWORTH, P. J.; MILLER, N. G. Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 378-391. 1996.

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

HÄRTEL, S.; DIEHL, H. A.; OJEDA, F. S. Methyl- β -Cyclodextrins and Liposomes as Water-Soluble Carriers for Cholesterol Incorporation into Membranes and Its Evaluation by a Microenzymatic Fluorescence Assay and Membrane Fluidity-Sensitive Dyes. **Analytical Biochemistry**, v.258, p.277-284. 1998.

HARTWIG, F. P.; **Efeito da adição de colesterol sobre a viabilidade e fertilidade de espermatozoides equinos refrigerados**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 2013, 85f. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP. 2013.

HARTWIG, F. P.; LISBOA, F. P.; HARTWIG, F. P.; MONTEIRO, G. A.; MAZIERO, R. R. D.; FREITAS-DELL’AQUA, C. P.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; DELL’AQUA JR, J. A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v.81, p.340-346. 2014.

HERNÁNDEZ, P. J. E.; FERNANDÉZ, R. F.; RODRÍGUEZ, S. J. L.; SOTO, M. Y. G.; VERONA, J. E. H.; GARCÍA, R. A. D. Post-thaw acrosomal viability and reaction in sperm obtained from equine epididymis tail. **Rev. Salud Anim.**, v.34, p.84-88. 2012.

HOLT, W.; HEAD, M.; NORTH, R. D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v.46, p. 1086-1094. 1992.

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

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Partially Irreversible Cold-Induced Lipid Phase Transitions in Mammalian Sperm Plasma Membrane Domains: Freeze-Fracture Study. **The Journal of Experimental Zoology**, v.230, p.473-483.

IDZIOREK, T.; ESTAQUIER, J.; BELS, F.; AMEISEN, J.-C. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. **Journal of Immunological Methods**, v.185, p.249-258. 1995.

JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. **The Veterinary Clinics of North America – Equine Practice**, v.8, p.129-148. 1992.

JØRGENSEN, N.; AUGER, J.; GIWERCMAN, A.; IRVINE, D. S.; JENSEN, T. K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.; LE BON, C.; MACDONALD, E.; PEKURI, A. M.; SCHEIKE, T.; SIMONSEN, M.; SUOMINEN, J.; SKAKKEBOEK, N. E. Semen analysis performed by diferente laboratory teams: na intervariation study. **Int J Androl.**, v.20, p.201-208. 1997.

KIRK, E. S.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Increasing membrane cholesterol contente benefits the motility of cooled equine semen. **Anim Reprod Sci**, v.68, p.315-365. 2001.

KIRK, E. S.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Comparison of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p. 1422–1439. 2005.

KONYALI, C.; TOMÁS, C.; BLANCH, E.; GÓMEZ, E. A.; GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival. **Cryobiology**, v.67, p.124-131. 2013.

LAGARES, M. A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Assessing equine sperm-membrane integrity. **Andrologia**, v.32, p.163-167. 2000.

LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 379-386. 1992.

LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54. 1997.

LAMIRANDE, E.; O'FLAHERT, C. Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 106-115. 2008.

LANÇONI, R. **Uso da melatonina e do ácido ferúlico como promotores da função do espermatozoide equino criopreservado**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), 74f., 2015. Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2015.

LANGLAIS, J.; ROBERTS, K. D. A Molecular Membrane Model of Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction of Mammalian Spermatozoa. **Gamete Research**, v.12, p.183-224. 1985.

LARSEN, L.; SCHEIKE, T.; JENSEN, T. K.; BONDE, J. P.; ERNST, E.; HJOLLUND, N. H.; ZHOU, Y.; SKAKKEBÆK, N. E.; GIWERCMAN, A. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. **Human Reproduction**, v.15, p.1562-1567. 2000.

LONE, S. A.; PRASAD, J. K.; GHOSH, S. K.; DAS, G. K.; KUMAR, N.; BALAMURUGAN, B.; KATIYAR, R.; VERMA, M. R. Effect of cholesterol loaded cyclodextrin (CLC) on lipid peroxidation and reactive oxygen species levels during cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v.5, p.476-480. 2016.

LONGOBARDI, V.; ALBERO, G.; CANDITIIS, C.; SALZANO, A.; NATALE, A.; BALESTRIERI, A.; NEGLIA, G.; CAMPANILE, G.; GASPARRINI, B. Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (*Bubalus bubalis*) cryopreserved sperm. **Theriogenology**, v.89, p.359-364. 2017.

LOOMIS, P. R.; SQUIRES, E. L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, p. 480-491. 2005.

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, n. 1, p. 119-128, 2008.

MACHADO, J. Pêga em alta, por que os jumentos valem tanto. **Revista Horse**, n.24, p.28-34. 2010.

- 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 Nterminal kinase (JNKs) pathway. **Journal of Andrology**, v. 33, p. 105-113. 2011.
- MADISON, R. J.; EVANS, L. E.; YOUNGS, C. R. The Effect of 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin on Post-Thaw Parameters of Cryopreserved Jack and Stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.272-278. 2013.
- MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.; CEROLINI, S.; PENNY, P.; NOBLE, R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Theriogenology**, v. 63, p.411-421. 2005.
- MAO, J.; WU, G.; PRATHER, R. S.; SMITH, M. F. Effect of methyl- β -cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. **Theriogenology**, v.64, p.1913-1927. 2005.
- MARTÍ, E.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.27, p.746-753. 2006.
- MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computarizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.225-232. 2008.
- MATYUS, L.; SZABO, J. R. G.; RESLI, I.; GASPAR JR, R.; DAMJANOVICH, S. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. **Acta Biochimica et Biophysica Acta**; v. 19, p. 209-214. 1984.
- MESEGUER, M.; GARRIDO, N.; MARTINEZ-CONEJERO, J. A.; SIMÓN, C.; PELLICER, A.; REMOHÍ, J. Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. **Fertility and Sterility**, v.81, p.588-594. 2004.
- MIRÓ, J.; TABERNER, E.; RIVERA, M.; PEÑA, A.; MEDRANO, A.; RIGAU, T.; PEÑALBA, A. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. **Theriogenology**, v.72, p.1017-1022. 2009.
- MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMAS, C.; GRAHAM, J. K. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.57-66. 2010.
- MOCÉ, R.; GRAHAM, J. K. Effect of egg yolk, cooling/thawing rates and cholesterol on cryosurvival of rabbit sperm. In: The American Society of Andrology, 30th Annual Meeting of the American Society of Andrology, Seattle, WA, USA. *J Androl Suppl*, v.79, abstract 121. 2005.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, v.84, p.826-833. 2006.

- MOCÉ, E.; PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.236-247. 2010.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, p.2372-2381. 2005.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v.51, p.241-249. 2005.
- MORAES, E. A.; TORRES, C. A. A. ROMUALDO, P. L.; GRAHAM, J. K. Delivering cholesterol to boar sperm membranes improves cryosurvival. **Cryobiology**, v.59, p.416. 2009.
- MORAES, E. A.; GRAHAM, J. K.; TORRES, C. A. A.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p.148-154. 2010.
- MORAES, E. A.; MATOS, W. C. G.; GRAHAM, J. K.; FERRARI JR, W. D. Cholestanol-loaded-cyclodextrin improves the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.158, p.19-24. 2015.
- MORRIER, A.; BAILEY, J. L. Cholesterol loaded methyl- β -cyclodextrin protects ram sperm during cryopreservation and cold-shock. **Theriogenology**, v.63, p.423-424. 2005.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction**, v.3, p.403-439. 1997.
- MOVASSAGHI, S.; SAKI, G.; JAVADNIA, F.; PANAHI, M.; MAHMOUDI, M.; RHIM, F. Effects of methyl- β -cyclodextrin and cholesterol on cryosurvival of spermatozoa from C57BL/6 mouse. **Pak J Biol Sci**, v.12, p.19-25. 2009.
- MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; PINCEMY, G.; KURZ, A.; LABBE, C. Characterization of Sperm Plasma Membrane Properties after Cholesterol Modification: Consequences for Cryopreservation of Rainbow Trout Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.78, p.390-399. 2007.
- MURPHY, C.; ENGLISH, A. M.; HOLDEN, S. A.; FAIR, S. Cholesterol-loaded cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 145, p. 123-129. 2014.
- NASEER, Z.; AHMAD, E.; AKSOY, M; KÜÇÜK, N.; SERIN, I.; CEYLAN, A.; BOYACIOĞLU, M.; KUM, C. Cryobiology Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. **Cryobiology**, v.71, p.18-23. 2015.
- NEILD, D. M.; GADELLA, B. M.; CHAVES, M. G.; MIRAGAYA, M. H.; COLENBRANDER, B.; AGÜERO, A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v.59, p.1693-1705. 2003.

NEILD, D. M.; GADELLA, B. M.; AGÜERO, A.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.47-56. 2005.

NEILD, D. M.; BROUWERS, J. F.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B. M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 230-238. 2005.

OHVO, H.; SLOTTE, P. Cyclodextrin-Mediated Removal of Sterols from Monolayers: Effects of Sterol Structure and Phospholipids on Desorption Rate. **Biochemistry**, v.35, p.8018-8024. 1996.

OLIVEIRA, J. V. Estudo de metodologias para a criopreservação de sêmen de jumentos (*Equus asinus*) por meio de testes laboratoriais e fertilidade. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 2005, 110f. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2005.

OLIVEIRA, C. H. **Avaliação das características do espermatozóide eqüino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 2007, 85f. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2007.

OLIVEIRA, R. R. **Efeito *in vitro* da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoides criopreservados de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia), 2010, 92 f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

OLIVEIRA, C. H.; VASCONCELOS, A. B.; SOUZA, F. A.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVA, M. X.; VARAGO, F. C.; LAGARES, M. A. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.194-200. 2010.

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

OLIVEIRA, R. R.; RATES, D. M.; PUGLIESI, G.; KER, P. G.; ARRUDA, R. P.; MORAES, E. A.; CARVALHO, G. R. Use of Cholesterol-Loaded Cyclodextrin in Donkey Semen Cryopreservation Improves Sperm Viability but Results in Low Fertility in Mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p.845-850. 2014.

OSÓRIO, J. P.; CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; SILVA, E. C.; LIMA, A. L. Princípios do Congelamento de Sêmen do Garanhão. **Ciênc. Biol. Saúde**, v.10, p.15-22. 2008.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; SOTILLO-GALÁN, Y.; VARELA-FERNÁNDEZ, E.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; MURIEL, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, 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.; MORRELL, J. M.; SALAZAR- SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11,

increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v.138, p.55-63. 2009.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.393-403. 2009.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, 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.

PALACÍN, I.; VICENTE-FIEL, S.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L. Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. **Small Ruminant Research**, v.112, p.128-135. 2013.

PAMORNSAKDA, T.; POJPRASATH, T.; SUWIMONTEERABUTR, J.; THARASANIT, T. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen–thawed equine epididymal sperm. **Cryobiology**, v.63, p.90-95. 2011.

PARKS, J. E.; MEACHAN, T. N.; SAACKE, R. G. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidilcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids, and viability at 4°C and 37° C. **Biol Reprod**, v.24, p.399-404. 1981.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222. 1992.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid Composition and Thermotropic Phase Behavior of Boar, Bull, Stallion , and Rooster Sperm Membranes. **Cryobiology**, v.29, p.255-266. 1992.

PEÑA, F. J.; GARCÍA, B. M.; SAMPER, J. C.; APARICIO, I. M.; TAPIA, J. A.; FERRUSOLA, C. O. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, v. 76, p. 1177-1186. 2011.

PEÑA, F. J.; DAVILA, M. P.; BALL, B. A.; SQUIRES, E. L.; MARTIN MUÑOZ, P.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; SILVA, C. B. The Impact of Reproductive Technologies on Stallion Mitochondrial Function. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.529-537. 2015.

PEÑA, F. J.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; MARTIN MUÑOZ, P. New flow cytometry approaches in equine andrology. **Theriogenology**, v.86, p.366-372. 2016.

PEÑA, F. J.; MARTIN-MUÑOZ, P.; ORTEGA-FERRUSOLA, C. Advances in flow cytometry in basic and applied equine andrology. **Animal Reproduction**, v.14, p.136-142. 2017.

PICKETT, B. W.; FAULKNER, L. C.; SUTHERLAND, T. M. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. **J. Anim Sci**, v.31, p.713-728. 1970.

POMMER, A. C.; RUTLAND, J.; MEYERS, S. A. Phosphorylation of Protein Tyrosine Residues in Fresh and Cryopreserved Stallion Spermatozoa under Capacitating Conditions. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1208-1214. 2003.

PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of Adding Cholesterol to Bull Sperm Membranes on Sperm Capacitation, the Acrosome Reaction, and Fertility. **Biology of Reproduction**, v.71, p.522-527. 2004.

PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v.48, p.36-45. 2004.

PURDY, P. H.; FOX, M. H.; GRAHAM, J. K. The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. **Cryobiology**, v.51, p.102-112. 2005.

PURDY, P. H.; MOCÉ, E.; STOBART, R.; MURDOCH, W. J.; MOSS, G. E.; LARSON, B.; RAMSEY, S.; GRAHAM, J. K.; BLACKBURN, H. D. The fertility of ram sperm held for 24h at 5 degrees C prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 231-235. 2010.

QUINN, P. J.; WHITE, I. G. Phospholipid and cholesterol content of epididymal and ejaculated ram spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.20, p.1205-1215. 1967.

RATES, D. M. **Efeito da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoides sobre o congelamento e fertilidade do sêmen de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), 2011, 97 f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

RATES, D. M. **Membrana plasmática: Criopreservação e capacitação de espermatozoides equinos**. Tese (Doutorado em Zootecnia), 125f, 2015. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2015.

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.

Revisão do estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 56f. 2016.

RICKER, J. V.; LINFOR, J. J.; DELFINO, W. J.; KYSAR, P.; SCHOLTZ, E. L.; TABLIN, F.; CROWE, J. H.; BALL, B. A.; MEYERS, S. A. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, v.74, p.359-365. 2006.

RODRIGUEZ, M.; SCHAPER, J. Apoptosis: measurement and technical issues. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.38, p.15-20. 2005.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. **Animal Reproduction**, v.10, p.148-159. 2013.

SAMPER, J. C.; HELLANDER, J.C.; CRABO, B. G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.44, p.107-114. 1991.

SGONC, R.; GRUBER, J. Apoptosis detection: an overview. **Experimental Gerontology**, v.33, p.525-533. 1998.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.20-26. 2015.

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

SILVA, C. M. B.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; BOLAÑOS, J. M. G.; DÁVILA, M. P.; MARTÍN-MUNHOZ, P.; MORRELL, J. M.; RODRIGUÉZ-MARTÍNEZ, H.; PEÑA, F. J. Effect of Overnight Staining on the Quality of Flow Cytometric Sorted Stallion Sperm: Comparison with Traditional Protocols. **Reproduction in Domestic Animals**. 2014.

SILVEIRA, C. O. **Inclusão de colesterol na membrana plasmática de espermatozoides caprinos**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 2013, 54f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2013.

SINGER, S. J.; NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p.720-731. 1972.

SOUSA, D. B. **Variabilidade das sub-populações de espermatozoides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), 2007, 122f. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, SP, 2007.

SPIZZIRI, B. E.; FOX, M. H.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.255-264. 2010.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K. VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUMMER, J. E. Cooled and frozen stallion semen, Fort Collins: Animal Reproduction Biotechnology Laboratory, **Colorado State University**, Bulletin (09). 1999.

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

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, S. K.; GHOSH, S. K.; KUMAR, A.; PERUMAL, P.; JEROME, A. Acrosome membrane integrity and cryocapacitation are related to cholesterol content of bull spermatozoa. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 2, p. 126-131. 2013.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **User's guide**. Cary: SAS Institute, 2002. 525p.

THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A.; BALL, B. A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1531-1550. 2006.

- TOMÁS, C.; BLANCH, E.; HERNÁNDEZ, M.; GIL, M. A.; ROCA, J.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A.; MOCÉ, E. Treating boar sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins widens the sperm osmotic tolerance limits and enhances the in vitro sperm fertilising ability. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.209-220. 2011.
- TORRES, C. A. A.; MORAES, E. A.; GRAHAM, J. K.; ROMUALDO, P. L. The effect of adding cholesterol-loaded cyclodextrin on boar sperm cryosurvival. **Biol. Reprod.**, v.81, p.455. 2009.
- TREVIZAN, J. T. Influência dos danos oxidativos na qualidade espermática em bovinos de diferentes idades. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 2013, 62f. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, SP, 2013.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v.50, p.793-806. 1998.
- VARNER, D. D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v.70, p.448-462. 2008.
- VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v.47, p.16-24. 2015.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M. ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179. 2002.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, A. M.; JULIENNE, P.; EVAÏN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v.48, p.907-917. 1997.
- VIDAMENT, M.; COGNARD, E.; YVON, J-M.; SATTTLER, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Evaluation of Stallion Semen Before and After Freezing. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p.271-277. 1998.
- VIDAMENT, M.; PIERRICK, V.; MARTIN, F. X. 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.
- WALTERS, Eric M. et al. The history of sperm cryopreservation. Sperm banking: theory and practice. **Cambridge University Press**, Cambridge, UK, p. 1-17, 2009.
- WATERHOUSE, K. E.; DE ANGELIS, P. M.; HAUGAN, T.; PAULENZ, H.; HOFMO, P. O.; FARSTAD, W. Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. **Theriogenology**, v.62, p.1638-1651. 2004.
- WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. **Reproductive Biology**, v. 1, p. 183-350. 1979.
- WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris, G.J., Clarke, A.: Effects of low temperatures on biological membranes. London, Academic Press, 1981.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing 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.60, p.481-492. 2000.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptakes of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 639-658. 1993.

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. **Theriogenology**, v.46, p.559-578. 1996.

WITTE, T. S.; SCHÄFER-SOMI, S. Involvement of cholesterol, calcium and progesterone in the induction of capacitation and acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.181-193. 2007.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neil, J.D. The physiology of reproduction. New York: Raven Press; p.189-317. 1994.

YANCEY, P. G.; RODRIGUEZA, W. V.; KILSDONK, E. P. C.; STOUT, G. W.; JOHNSON, W. J.; PHILIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Cellular Cholesterol Efflux Mediated by Cyclodextrins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.16026-16034. 1996.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; ROCHA, L. G.; MARÍN, H.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; MIRÓ, J. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. **Andrology**, v. 2, p. 1-13. 2014a.

ZAHN, F. S.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JR, J. A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane : effects on post-thaw sperm parameters and fertility. **Theriogenology**, v.58, p.237-240. 2002.

ZENG, W-X.; TERADA, T. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.22, n.1, p.111-118. 2001.

ANEXOS

ANEXO A

Meio Tyrode modificado (STALP) – 1000 mL (MOORE *et al.*, 2005)

Componentes	Quantidade
<i>NaCl</i>	2,16 g
<i>KCl</i>	0,75 g
<i>KH₂PO₄</i>	0,14 g
<i>NaHCO₃</i>	3,0 g
<i>MgSO₄</i>	0,29 g
<i>HEPES</i>	2,4 g
<i>CaCl₂</i>	0,22 g
<i>Frutose</i>	15,1 g
<i>Glucose</i>	1,1 g
<i>Na Piruvato</i>	0,02 g
<i>Na Lactato</i>	3,7 mL
<i>Albumina Sérica Bovina (BSA)</i>	3,0 g
<i>Água destilada</i>	1000

*Osmolaridade (300 – 310 mOsm/Kg)

* pH (7,2 – 7,4)

ANEXO B

DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

1. Iodeto de propídeo (IP)

Solução estoque (SE): 25 mg/mL (40 mM)

1 mL de DMSO + 25 mg de IP

Solução de trabalho: 0,5 mg/mL (0,8 mM)

20 µL de SE + 980 µL de PBS

2. FITC-PSA

Solução de trabalho: 100 µg/mL

20 mg de FITC-PSA + 1 mL de PBS → Homogeneizar.

Em outro tubo: 18 mL de PBS + 1 mL de solução de azida de sódio 1% + 1 mL da solução do FITC-PSA

*Solução de azida de sódio 1%: 0,2 g de azida de sódio + 20 mL de PBS

3. JC-1

Solução estoque: (1,53 mM)

5 mg JC-1 + 5 mL de DMSO

Solução de trabalho: (153 mM)

100 µL SE + 900 µL DMSO

4. C11-BODIPY^{581/591}

Solução de trabalho: (1 mg/mL)

1 mM de C11-BODIPY^{581/591} + 1 mL de DMSO

5. M540 – Merocianina

Solução estoque: 1 mg/mL

1 mg de Merocianina + 1 mL de DMSO

Solução de trabalho: 0,5 mg/MI

1 mL de SE + 1 mL de DMSO

6. SYTO 59

Solução estoque:

100 μ L de Syto + 900 μ L de DMSO

Solução de trabalho:

6 μ L SE + 3994 μ L de DMSO

7. DHE

Solução estoque:

2,4 μ M de DHE + 150 μ L de DMSO

Solução de trabalho:

72 μ L de SE + 928 μ L de DMSO

8. YO-PRO

Solução de trabalho: 7,5 μ M

1,5 μ L de Yo-Pro + 198,5 μ L de DMSO

ANEXO C

Meio TALP SPERM (BAVISTER *et al.*, 1983)

1. Soluções de sais de TALP (para preparar 500 mL)

Componentes	Quantidade (g)
<i>NaCl</i>	2,100
<i>KCl</i>	0,935
<i>NaHCO₃</i>	1,05
<i>NaH₂PO₄</i>	0,025
<i>CaCl₂.H₂O</i>	0,145
<i>MgCl₆H₂O</i>	0,04
<i>HEPES</i>	3,25

Preparo:

- Diluir $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgCl}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 200 mL de água Mili-Q;
- Diluir os outros componentes em 200 mL de água Mili-Q;
- Associar as duas soluções e completar com água Mili-Q até completar 500 mL;
- Filtrar;
- Manter refrigerado.

2. Soluções de metabólitos glicosados

A. Solução estoque (para preparar 500 mL)

Componentes	Quantidade
<i>Glicose</i>	2,500 g
<i>Lactato de sódio</i>	9,25 mL
<i>Piruvato de sódio</i>	70 mg
<i>Pen-Strep</i>	12,5 mL

Preparo:

- Dissolver todos os componentes;
- Preparar alíquotas de 5 mL
- Manter congelado a -20° C.

B. Solução de trabalho

- Pipetar 45 mL da solução de sais de TALP;
- Ajustar pH para 7,4;
- Adicionar 5 mL da solução estoque de metabólitos glicosados;
- Filtrar em filtro de 0,45 µm;
- Preparar alíquotas de 300 µL
- Manter congelado a -20° C.

3. Preparo do dia

- Solução de sais de TALP.....10 mL
- Solução trabalho de metabólitos glicosados.....200 µL
- Albumina Sérica Bovina (BSA).....100 mg

Preparo:

- Dissolver BSA e metabólitos glicosados em TALP e incubar por 10 minutos;
- Ajustar o pH para 7,4;
- Filtrar em filtro de 0,45 µm.

ANEXO D

SETUP SISTEMA SCA (Sperm Class Analyser, Microptic, Barcelona, Espanha)

Características	Ajuste
Número de imagens adquiridas.....	25
Taxa de aquisição de imagens (por segundo).....	22
Tamanho mínimo da célula.....	15 μm^2
Valor de corte do VCL para células rápidas.....	>90 $\mu\text{m/s}$
Valor de corte do VCL para células lentas.....	<15 $\mu\text{m/s}$
Retilinearidade (STR), Limiar.....	>75%
Movimento circular (LIN).....	<50%
Temperatura.....	37° C