

AMANDA REZENDE NOGUEIRA MOREIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA
MANGALARGA MARCHADOR EM DILUIDORES COM DIFERENTES
CRIOPROTETORES ASSOCIADOS OU NÃO À ANTOCIANINA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

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

T

M838c
2016
Moreira, Amanda Rezende Nogueira, 1991-
Criopreservação de sêmen de garanhões da raça
Mangalarga Marchador em diluidores com diferentes
crioprotetores associados ou não à antocianina. / Amanda
Rezende Nogueira Moreira. - Viçosa, MG, 2016.
ix, 40f. : il. ; 29 cm.

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

Referências bibliográficas: f.33-40.

1. Equino. 2. Mangalarga(Cavalo). 3. Criopreservação.
4. Sêmen. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.1

AMANDA REZENDE NOGUEIRA MOREIRA

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA
MANGALARGA MARCHADOR EM DILUDORES COM DIFERENTES
CRIOPROTETORES ASSOCIADOS OU NÃO À ANTOCIANINA**

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

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres

Jurandy Mauro Penitente Filho

Profa. Bruna Waddington de Freitas

Prof. José Domingos Guimarães

Prof. Eduardo Paulino da Costa

(Orientador)

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Reconhecendo que sem fé eu nada teria alcançado, meu primeiro “muito obrigada” é para Deus, que não me faltou em momento algum, se mostrando sempre e cada dia mais, presente na minha vida.

Aos meus pais e companheiros, Miriam, Jaime, Ângelo e Ana Adelia, bem como toda minha família, pelo incentivo, amor, direção e base, sem os quais eu jamais teria chegado até aqui.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa e ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Ao meu orientador José Domingos Guimarães por acreditar nesse projeto, pela atenção e pelos ensinamentos ao longo dos cursos de graduação e pós-graduação, palavras que estendo à minha co-orientadora Maria Verônica. Aos colegas da Reprodução pelo apoio na realização do projeto, em especial Bruna, Paula e Jurandy.

Ao professor e mestre Rafael Goretti por nortear o meu caminho. Aos colegas Rodrigo, Juliana, Rafael (Abelha) e toda equipe Criohorse, em especial Renan e Paulo Henrique por terem me recebido de braços abertos, se empenhando incansavelmente na execução desse projeto, tendo colaborado para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos Haras Maré Mansa e 2L, por terem aberto as portas, tornando-se peças fundamentais nesse trabalho, agradeço em nome das pessoas: Marcio (CIU), Lilian, Edmar e Daniela.

Ao Bernardo e a Brasil Reprodução pela compreensão, paciência e oportunidade concedida.

As amigas e irmãs de república: Débora, Bruna e Gilmara, nas pessoas das quais aproveito para agradecer a todos os amigos com quem mesmo à distância, sempre pude contar e sem os quais, sem dúvida não estaria dando mais esse passo.

Ao Fernando e ao Cristian, em nome de toda equipe do setor de equideocultura da Universidade Federal de Viçosa. A Rose, funcionária da secretaria de pós-graduação do departamento de Veterinária, pela dedicação.

Por último, aqueles de quem injustamente possa ter me esquecido de mencionar e que me ajudaram direta ou indiretamente a concluir mais uma etapa da minha vida profissional.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Parâmetros seminais de garanhão.....	2
2.2. Criopreservação do sêmen equino.....	3
2.3. Crioprotetores.....	4
2.3.1. Glicerol.....	6
2.3.2. Etilenoglicol.....	6
2.3.3. Amidas.....	7
2.4. Antioxidantes.....	8
2.4.1. Antocianina.....	8
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1. Delineamento experimental.....	9
3.2. Coleta do sêmen.....	11
3.3. Criopreservação do sêmen.....	12
3.4. Extração da antocianina.....	13
3.5. Análise do sêmen fresco.....	13
3.5.1. Volume do ejaculado livre de gel (mL).....	13
3.5.2. Motilidade progressiva e vigor espermáticos.....	13
3.5.3. Concentração espermática.....	14
3.5.4. Teste Hiposmótico.....	14
3.5.5. Morfologia espermática.....	14
3.6. Análise do sêmen pós-descongelamento.....	15
3.6.1. Teste de termorresistência (TTR).....	15
3.6.2. Citometria de fluxo.....	15
3.6.2.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal(sondas IP/FITCA).....	16
3.6.2.2. Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular (sondas DCFDA/ IP).....	17

3.6.2.3. Avaliação da organização da bicamada lipídica (sondas M540/ IP).....	18
3.6.2.4. Avaliação do potencial mitocondrial (sonda JC-1).....	19
3.7. Análise estatística.....	20

PARTE I

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CRIOPROTETORES E DA ANTOCIANINA SOBRE O CONGELAMENTO DE SÊMEN DE GARANHÃO DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
CONCLUSÕES	23

PARTE II

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR EM DILUIDORES COM DIFERENTES CRIOPROTETORES ASSOCIADOS OU NÃO À ANTOCIANINA

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÕES	32

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
--	-----------

RESUMO

MOREIRA, Amanda Rezende Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador em diluidores com diferentes meios crioprotetores associados ou não à antocianina.** Orientador: José Domingos Guimarães. Co-orientadores: Maria Verônica de Souza e Leandro Licursi de Oliveira.

O presente estudo teve como objetivo a avaliação comparativa dos crioprotetores glicerol, etilenoglicol e dimetilformamida, além da adição de antocianina ao meio base de congelamento, como tentativa de minimizar os danos celulares oriundos do processo de criopreservação. Foram utilizados seis garanhões da raça Mangalarga Marchador, maduros sexualmente, hípidos e aprovados para reprodução por meio de exame andrológico. As coletas de sêmen foram realizadas com intervalos de dois dias pelo método da vagina artificial com auxílio de uma fêmea em estro natural ou induzido ou manequim, totalizando cinco ejaculados por garanhão. A primeira etapa do estudo teve por finalidade determinar a melhor concentração destes crioprotetores e aditivo para que fosse usada na etapa seguinte. Para este fim foram realizadas análises de motilidade espermática progressiva total e vigor espermático. Verificou-se que as concentrações de 4, 5 e 6 % de etilenoglicol e dimetilformamida utilizadas isoladamente nos diluentes de criopreservação não tiveram diferença ($P > 0,05$) sobre os parâmetros de motilidade espermática progressiva total e vigor espermático. Os mesmos crioprotetores utilizados em associação podem ser feitos nas proporções 1:4 e 2:3 % (etilenoglicol : dimetilformamida) sem proporcionar diferenças nos parâmetros físicos do sêmen criopreservado. A antocianina pode ser usada nas concentrações de 0,5 e 3 $\mu\text{L}/100$ milhões de espermatozoides, mas não na concentração de 9 $\mu\text{L}/100$ milhões de espermatozoides. Na segunda etapa, as amostras de sêmen criopreservadas foram submetidas às análises físicas convencionais (motilidade espermática progressiva total e vigor espermático), teste de termo-resistência e a análise do grau de integridade das células espermáticas utilizando sondas fluorescentes e analisados por meio da citometria de fluxo. Os tratamentos experimentais foram assim constituídos: Controle Botucio (B); Etilenoglicol 4% (E); Dimetilformamida 5% (D); Etilenoglicol +

Dimetilformamida (ED) ou associados com antocianina (BA, EA, DA e EDA) na concentração 0,5 µL/100 milhões de espermatozoides. Nos tratamentos E e EA verificou-se os piores valores médios em todos os testes, enquanto nos tratamentos D e DA se mostraram menos agressivos às membranas plasmática e acrossomal. Os valores médios de motilidade espermática progressiva total e vigor espermático foram semelhantes em todos os tratamentos, exceto nos tratamentos E e EA, que foram inferiores. No entanto, os tratamentos empregando o diluente a base de dimetilformamida caíram aproximadamente 50 % nos valores de motilidade espermática nos primeiros 30 minutos do teste de termorresistência quando comparados ao tratamento controle (B) ou acrescido de antioxidante (BA). Resultado condizente com os valores percentuais de células com o potencial de membrana mitocondrial íntegro quantificados por meio de citometria de fluxo. A antocianina parece ter efeito neutralizador de radicais livres produzidos por células inviáveis, podendo ser utilizada como antioxidante não penetrante na criopreservação do sêmen de equinos da raça Mangalarga Marchador.

ABSTRACT

MOREIRA, Amanda Rezende Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Semen cryopreservation of Mangalarga Marchador stallions using diluent with different cryoprotectants associated or not with anthocyanin.** Adviser: José Domingos Guimarães. Co-advisers: Maria Verônica de Souza and Leandro Licursi de Oliveira.

The present study aimed at comparative assessment of glycerol, ethyleneglycol and dimethylformamide as cryoprotectants, and the addition of an anthocyanin in the extender base of freezing, as an attempt to minimize cell damage arising from the cryopreservation process. Six stallions Mangalarga Marchador breed, sexually mature, healthy and approved for breeding by breeding soundness evaluation were used. Semen was collected in intervals of two days by artificial vagina method with the aid of a female in natural or induced estrus or manikin, totalizing five ejaculates per stallion. The first stage of the study aimed to determine the best concentration of these cryoprotectants and additive to be used on the following stage. For this purpose were conducted analysis of spermatic progressive motility and spermatic vigor. As results the concentrations of 4, 5 and 6% ethyleneglycol and dimethylformamide used alone had no differences ($P > 0.05$) on the spermatic progressive motility and spermatic vigor. The same cryoprotectants can be used in association in the proportions 1:4 and 2:3% (ethyleneglycol: dimethylformamide) without differences in the physical parameters of cryopreserved semen. The anthocyanin may be used in concentrations of 0.5 and 3 μL / 100 million of spermatozoa, but not on the concentration of 9 μL / 100 million of spermatozoa. At the second stage, the semen cryopreserved samples were subjected to conventional physical analysis (total spermatic motility and spermatic vigor), thermal resistance test, and analysis of the level of integrity of sperm cells using fluorescent probes by flow cytometry. The treatments were constituted as follows: Control Botucio (B); 4 % Ethyleneglycol (E); Dimethylformamide 5 % (D); Ethyleneglycol + Dimethylformamide (ED) or associated with anthocyanin (BA, EA, DA, and EDA) at 0.5 μL / 100 million spermatozoa concentration. For E and EA treatments, there were verified the worst average values for all tests, meanwhile D and DA treatments showed to be less aggressive to the plasma and acrosome membranes. The mean values of

spermatic progressive motility and spermatic vigor were similar for all treatments, except for the treatments E and EA, which presented inferior results. Even though, diluents Dimethylformamide-based treatments dropped almost 50 % in the spermatic motility values at the first 30 minutes of the thermal resistance test compared to control treatment (B) or with anthocyanin added (BA). This result was consistent with the percentual values of cells with intact mitochondrial membrane potential quantified by flow cytometry. Anthocyanin seems to have a scavenger effect over free radicals produced by unviable cells and can be used as non-penetrating antioxidant for cryopreservation in equine semen of Mangalarga Marchador breed stallions.

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial revolucionou a forma de lidar com a reprodução dos rebanhos, uma vez que aumentou significativamente o número de fêmeas cobertas por um mesmo macho em um espaço de tempo reduzido. O intercâmbio de material genético tem facilitado a evolução das raças puras no Brasil e internacionalmente. No entanto, a técnica tornou-se potencialmente problemática ao se deparar com a dificuldade de armazenamento do ejaculado. Ainda há a dificuldade no que diz respeito à criopreservação desse material para transporte, aqui ressaltando a qualidade do sêmen congelado para inseminação artificial em equinos, tendo taxas de fertilidade reduzidas quando comparadas ao uso de sêmen in natura ou resfriado (Jobim et al., 2011).

Ao passar pelo processo de congelamento, os espermatozoides sofrem danos causados pela temperatura, pela desidratação celular excessiva e pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), provenientes do metabolismo espermático (Holt, 2000; Aurich, 2005). O estresse oxidativo pelo excesso de radicais livres causa danos ao DNA, motilidade espermática e interfere no processo de peroxidação da membrana lipídica (Guthrie & Welch, 2012). Diante do exposto, existe uma busca contínua por crioprotetores que possam ser utilizados isoladamente ou em associações, bem como de aditivos aos diluentes de congelamento, tais como os antioxidantes, como uma tentativa de melhorar a viabilidade espermática pós-descongelamento e, conseqüentemente, aumentar os índices de fertilidade. O glicerol é o crioprotetor mais utilizado para este fim, no entanto, estudos mostram seus efeitos nocivos e até deletérios às células espermáticas (Alvarenga, 2005; Hoffman, 2011). Por este propósito foi conduzido o presente estudo, avaliando as condições in vitro da viabilidade do sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador em resposta a diferentes crioprotetores associados ou não a um antioxidante.

Os crioprotetores escolhidos tiveram por competência substituir totalmente o glicerol utilizado nos diluentes comerciais, principalmente para a raça Mangalarga Marchador que conhecidamente não demonstra bons resultados com uso deste crioprotetor no congelamento de sêmen de garanhões (Alvarenga, 2007). A antocianina foi escolhida neste contexto pela sua capacidade antioxidante, como tentativa de minimizar os danos oxidativos ocasionados durante o processo de criopreservação (Volp, 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil possui o maior rebanho equino da América Latina e terceiro do mundo. A equideocultura nacional tem papel importante na cadeia social e econômica do país, são 800 mil empregos diretos e 3,5 milhões indiretos, movimentando R\$ 13 bilhões por ano no país, segundo dados de 2014 da Sociedade Nacional de Agricultura. Além disso, a expansão dos eventos equestres como cavalgadas, concursos de marcha, vaquejadas e feiras têm demonstrado o grande valor cultural do equino no país.

A raça Mangalarga Marchador (MM) conta com a maior associação de criadores da América Latina (ABCCMM, 2013) e é a raça que mais cresce no Brasil e no mundo desde 2012. A Associação conta com mais de 490.000 indivíduos registrados e 8700 sócios ativos, ocupando a terceira posição no mundo, segundo dados da ABCCMM em 2014.

Existem no Brasil cerca de 26 raças de cavalos de sela e tração e 6 Raças de pônei (Cintra, 2012) e sabe-se da grande variedade de padrões seminais entre elas (Jobim, 2011; Oliveira, 2014; Santos, 2015). Contudo, estudos com sêmen congelado nessa espécie foram negligenciados por anos, devido principalmente à grande resistência das associações em aceitar o uso desta biotécnica.

2.1. Parâmetros seminais de garanhão

A avaliação microscópica do sêmen tem sido um procedimento muito utilizado na rotina de campo pelos profissionais que trabalham com reprodução equina. Amann (1981) e Alvarenga(2005) afirmam que as avaliações dos órgãos reprodutores e laboratorial do sêmen são as melhores maneiras de mensurar ou prever a fertilidade de garanhões.

As glândulas sexuais acessórias do garanhão são constituídas por um par de ampolas dos ductos deferentes, uma próstata bilobulada, duas glândulas vesiculares e um par de glândulas bulbo uretrais. O ejaculado apresenta de 5 a 10 jatos e três frações, sendo as primeiras de maior concentração espermática. A última fração é constituída majoritariamente por gel, que funciona como tampão, evitando refluxo de sêmen pela vagina (CBRA, 2013).

O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) publicou parâmetros mínimos aceitáveis, de acordo com a apresentação do sêmen, para garantir em programas de inseminação artificial, sendo eles:

- Sêmen fresco: 5 bilhões de espermatozoides totais e mínimo de 60% destes com motilidade progressiva (MP);
- Sêmen resfriado: 200 a 500 milhões de espermatozoides com MP no momento da inseminação;
- Sêmen congelado: 400 milhões de espermatozoides com MP ao descongelamento.

A motilidade espermática progressiva, no entanto, não é o único parâmetro que deve ser considerado em uma amostra seminal. A morfologia espermática é correlacionada à fertilidade (Jaskoet al., 1992). Varner et al. (2013) afirmam que a porcentagem de espermatozoides normais é mais importante para a fertilidade que o tipo e quantidade de defeitos morfológicos. Contudo, existe certa controvérsia ao correlacionar os parâmetros seminais laboratoriais com a fertilidade a campo. Love (2011) mostrou que esta relação está abaixo de 50%, quando são avaliadas apenas motilidade espermática progressiva e morfologia espermática. Isto porque vários outros fatores influenciam na viabilidade embrionária e consolidação da prenhez, como manejo, fatores inerentes à fêmea e nutrição (Varner et al., 2013).

2.2. Criopreservação do sêmen equino

A criopreservação é definida como a preparação de uma suspensão de células para estocagem por meio de congelamento (em temperaturas inferiores a -80°C), que posteriormente retornam a temperaturas próximas à do organismo. Esta técnica pode acarretar prejuízos à função espermática ou até mesmo levar a morte celular (Jobim et al., 2011).

Durante o processo de congelamento/descongelamento, danos devido a baixas temperaturas podem ocorrer aos espermatozoides, como a formação de cristais de gelo intracelulares e aumento da concentração intracelular de solutos, resultantes da desidratação celular durante o processo de congelamento. As lesões podem ocorrer de forma direta, afetando estruturas celulares, como o rompimento da membrana, ou indireta, alterando a função metabólica das células (Holt, 2000). Tais afecções ocorrem principalmente durante o processo de resfriamento, quando os lipídeos sofrem mudança do estado fluido para gel, reduzindo a fluidez da membrana (Amann & Graham, 1992).

Entre as temperaturas de 37 e 20°C, as células sofrem poucos efeitos nocivos se diluídas em meio adequado (Kayser et al., 1992; Keith, 1998). As maiores injúrias ocorrem entre 19 e 8°C (Watson, 1995) respeitando curvas de resfriamento e congelamento. Um processo de queda de temperatura muito rápido contribui para a formação de cristais de gelo no interior das células, levando a lesões de membrana e danos ou fragmentação do DNA (Senger, 1986). Por outro lado, congelamento muito lento expõe a célula a uma solução supersaturada, gerando estresse osmótico que pode levar à morte celular (Watson, 1995). Portanto, a refrigeração prévia é essencial para o sucesso do congelamento (Fürst et al., 2005).

A centrifugação pode ser outro ponto crítico quando feita de maneira inadequada, ocasionando danos aos espermatozoides, além das perdas de até 25% na população espermática, sendo esta eliminada no sobrenadante (Loomis, 2005). O protocolo de centrifugação mais aceito hoje, foi proposto por Barrier-Battut et al. (2010) e preconiza 600 G por 10 min, em diluição 1:1 (dilúente:sêmen).

Para que seja considerada satisfatória, a criopreservação depende da curva de resfriamento, diluidor e crioprotetores utilizados, bem como da forma de descongelamento (Andrabi, 2007; Clulow et al., 2008). Ao descongelamento, é necessário que as células mantenham a integridade de suas membranas plasmática e acrossomal, motilidade espermática progressiva, DNA e proteínas essenciais, além de energia metabólica suficiente para alcançar o ovócito (Lemma, 2011).

2.3. Crioprotetores

Os crioprotetores são utilizados com o intuito de melhorar as condições do ambiente aos quais os espermatozoides estão expostos, minimizando os danos às membranas e impedindo a ativação prematura dos mecanismos de capacitação espermática e de reação acrossômica (Loomis, 2005). Uma das principais funções dos crioprotetores é proporcionar a formação de canalículos não congelados entre os cristais de gelo onde as células espermáticas ficarão alojadas (Holt, 2000).

Os agentes crioprotetores são classificados em permeáveis e não permeáveis (Rowe, 1966). Os não permeáveis são representados por macromoléculas com alto peso molecular, tais como os açúcares, lipoproteínas da gema do ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos, substâncias responsáveis por um mecanismo de proteção no meio extracelular (Aman & Pickett, 1987). Por serem solutos e não solventes, proporcionam a desidratação celular pelo aumento da osmolaridade do meio, dificultando a formação de

cristais de gelo no interior da célula (Graham, 1998). Os crioprotetores permeáveis agem tanto no meio interno quanto no externo limitando a expansão e retardando a formação dos cristais de gelo, além de reduzir as concentrações de soluto no meio extra e intracelular (Nash, 1966). São eles: álcoois (glicerol, etileno-glicol, metanol, entre outros) e as amidas (metilformamidas e dimetilformamidas).

Além da busca por crioprotetores alternativos, existe o desafio de determinar a concentração ideal destes a ser utilizada nos meios de congelamento. A quantidade de crioprotetor e de qualquer outra substância a ser acrescentada e misturada ao sêmen influencia diretamente a resposta das células ao processo de criopreservação (Amann&Picket, 1987; Leboeuf et al., 2000; Watson, 2000).

O glicerol é o crioprotetor mais estudado e o mais utilizado na espécie equina, variando nas concentrações de 2 a 5% (Keith, 1998; Vidament et al., 2000; Loomis&Graham, 2008). Em outras espécies essa concentração tende a ser pouco mais elevada: 7 a 10 % em bovinos, 2 a 10 % em cães e de 5 a 10 % em humanos (Farstad, 1996).

O etilenoglicol tem sido uma alternativa para substituição do glicerol em diversas espécies, podendo ser utilizado sozinho ou em associação a outros crioprotetores em concentrações que variam de 2 a 10 % (Bessa et al., 2006; Kim et al., 2012).

As amidas vêm sendo testadas nas concentrações de 2 a 11%, tanto isoladamente quanto em associação, apresentando bons resultados em peixes (Varela et al., 2012), bovinos e equinos (Medeiros, 2003; Gibb et al., 2013; Freitas et al., 2015). A superioridade da dimetilformamida em substituição total ao glicerol tem sido relatada por pesquisadores com sucesso em concentrações acima de 5% (Medeiros, 2003; Vidament et al., 2005), sendo que valores inferiores a isso podem não causar o mesmo efeito. Squires et al. (2004) observaram que aumentando-se a concentração de dimetilformamida de 4 para 5%, há melhoras na motilidade do sêmen quando comparadas a amostras contendo as mesmas concentrações de glicerol.

Hoffman et al. (2011) avaliaram diferentes concentrações dos crioprotetores glicerol, etilenoglicol, metilformamida e dimetilformamida em diluentes para congelamento de sêmen de garanhões, obtendo os melhores valores de motilidade espermática nas concentrações de 2 e 3% para todos os crioprotetores, sendo que garanhões considerados “maus congeladores” tendem a tolerar concentração menor de crioprotetor no diluente para congelamento.

O emprego da antocianina no congelamento de sêmen é recente, não havendo ainda resultados satisfatórios quanto às concentrações do flavonoide no diluente de congelamento, ou mesmo qualquer ação benéfica do mesmo. Mas há trabalhos mostrando efeito positivo com uso de antioxidantes no diluente (Ramos et al., 2012).

2.3.1. Glicerol

O glicerol foi o primeiro crioprotetor utilizado com sucesso (Polge et al., 1949) e ainda é o agente mais utilizado para o congelamento de sêmen da maioria das espécies, incluindo a equina (Alvarenga et al., 2005).

Trata-se de um crioprotetor permeável com forte capacidade de ligação com a água, oferecendo seis sítios de ligação (Silva et al., 2003). Quando comparado a outros crioprotetores, possui baixa permeabilidade, ou seja, atravessa a membrana plasmática com maior dificuldade e por isso, mais devagar (Glazaret et al., 2009), mesmo assim é considerado eficiente por tornar mais lenta a desidratação celular, contribuindo para a formação de canalículos não congelados (Doebbler, 1966).

Lovelock e colaboradores (1954) propuseram que o glicerol atue protegendo as células espermáticas dos efeitos nocivos da solução supersaturada durante o processo de congelamento, devido ao seu mecanismo de ação: propriedades coligativas, depressão do ponto de congelamento e a consequente queda da concentração de eletrólitos das frações não congelada da solução. No entanto, já foi provado (Watson, 1995; Hoffman, 2011) que essa substância causa efeitos deletérios sobre a fluidez e organização da membrana lipídica.

Em equinos, o uso do glicerol no congelamento de sêmen tem sido associado à baixa motilidade espermática pós-descongelamento e reduzida fertilidade (Gomes et al., 2002). Em 2003, Medeiros mostrou que garanhões da raça Mangalarga Marchador, em sua maioria, apresentam baixa congelabilidade com o uso do glicerol.

2.3.2. Etilenoglicol

O etilenoglicol é um álcool com propriedades bem semelhantes às do glicerol, porém com menor peso molecular e pode entrar na célula com maior facilidade que o glicerol (Phelpset al., 1999), proporcionando menores danos às membranas plasmática e acrossomal, por diminuir o estresse osmótico (Gilmoret al., 1995; Oliveira et al., 2010). Tem a possibilidade de ligação com átomos de hidrogênio em quatro sítios, podendo também efetuar ligações de hidrogênio na membrana plasmática dos espermatozoides (Kunduet al., 2000).

Alguns pesquisadores testaram a eficiência do etilenoglicol em comparação ao glicerol na criopreservação de sêmen equino (Mercante et al., 1995; Chenier, 1998; Arruda, 2000; Alvarenga, 2003 e Oliveira et al., 2010) e constataram semelhante atividade crioprotetora entre os dois álcoois e nenhuma diferença nos valores de motilidade espermática progressiva e vigor espermático ao descongelamento, apesar de tendência a melhores parâmetros com o emprego do etilenoglicol como crioprotetor. Oliveira et al. (2010) não registraram diferenças entre os dois tratamentos isoladamente (5 % etilenoglicol e 5 % glicerol), mas em associação (2 % glicerol + 3 % etilenoglicol) obteve melhores resultados. Neves et al. (2005) avaliaram ainda o percentual de gestação de éguas utilizando glicerol em comparação ao etilenoglicol no diluente de congelação e também não obteve diferenças apesar de observada diferença percentual que favorecia o etilenoglicol. Madeira et al. (2013) ao compararem o etilenoglicol com glicerol no congelamento de sêmen de touros, observaram melhores resultados de morfologia e integridade de membrana plasmática em espermatozoides expostos ao etilenoglicol.

2.3.3. Amidas

Apesar das amidas apresentarem somente três sítios de ligação de hidrogênio com a molécula de água, metade em comparação ao glicerol, elas possuem menores viscosidade e solubilidade em água em relação ao glicerol, o que permite maior permeabilidade de membrana (Nash, 1966; Ball & Vo, 2001), diminuindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico (Ball, 2001).

As amidas quando comparadas ao glicerol, podem conferir maior proteção estrutural às células espermáticas, além de apresentarem melhores resultados no congelamento de sêmen de garanhões classificados como “maus congeladores” (Alvarenga et al., 2005).

Apesar de a formamida não apresentar bons resultados na criopreservação de sêmen equino (Squires et al., 2004), a adição de grupos metil em moléculas como a acetamida e a formamida tornaram melhores os efeitos crioprotetores dessas moléculas, uma vez que aumenta a permeabilidade à membrana (Bianchi et al., 2008).

Ao comparar glicerol com dimetilacetamida, metilformamida e dimetilformamida, Medeiros (2003) obteve resultados melhores para a dimetilformamida, embora todas as amidas tenham sido superiores ao glicerol, no congelamento de sêmen de garanhões. Resultado semelhante foi obtido por Gomes et al.

(2002) ao congelarem sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, verificando superioridade pós-descongelamento nos tratamentos com dimetilformamida e metilformamida em comparação ao glicerol e dimetilacetamida.

2.4. Antioxidantes

Diz-se por ROS todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio. Seus efeitos nocivos às células espermáticas foram citados por Halliwell & Gutteridge (1999) quando da exposição de espermatozoide humano a altas concentrações de oxigênio, diminuindo rapidamente a motilidade dessas células. A membrana plasmática das células espermáticas possui grande quantidade de gordura insaturada e por esse motivo é tão sensível ao estresse oxidativo (Aurich, 2005).

A produção de ROS, é um processo fisiológico das células espermáticas, sendo essencial para a capacitação (Baumberet al., 2003; Aurich, 2005), contudo, quando a produção é excessiva, acarreta danos à membrana plasmática, ao DNA e à motilidade espermática, instalando-se um estresse oxidativo que diminui a chance de fertilização (Dona et al., 2011; Guthrie & Welch, 2012) e produção de embriões normais (Aitken et al., 2010).

O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é a principal ROS produzida pelos espermatozoides equinos, tendo efeito deletério à célula ao ser convertido via enzimática a peróxido de hidrogênio em condições acima da capacidade de defesa antioxidante do sêmen (Burnaugh, 2007).

O plasma seminal possui grande poder antioxidante por meio das enzimas catalases (CAT), superóxido dismutases (SOD) e glutatinoxidase (GPx) (Bustamante et al., 2006; Stradioliet al., 2006). Além destas, outros componentes do plasma seminal atuam de forma a degradar as ROS, tais como: albumina, tocoferol, taurina, hipotaurina, lactato, ergotionina e ácido ascórbico (Ball, 2011). No entanto, essa atividade antioxidante é perdida na ocasião da retirada quase total do plasma durante o processo de congelamento do sêmen.

O uso de compostos fenólicos na composição de diluentes para criopreservação de sêmen tem por objetivo utilizar a capacidade de oxirredução dessas substâncias para neutralizar as ROS, decompondo os peróxidos, prevenindo assim a ocorrência de danos espermáticos (Sikka, 2004).

2.4.1. Antocianina

As antocianinas pertencem ao grupo dos flavonoides e estão amplamente distribuídas na natureza, principalmente em algumas frutas vermelhas. Destacam-se pela sua alta capacidade antioxidante, sendo carreadoras de radicais livres (Volp, 2008). Suas características e benefícios na saúde humana por meio dos alimentos já foram descritas por pesquisadores (Kuskoski, 2006; Pereira, 2012), porém pouco se sabe sobre seus efeitos diretos nos gametas. Sabe-se que a produção de ROS é intensa no metabolismo espermático e que esses fatores, em excesso, são prejudiciais às células.

As antocianinas estabilizam as ROS se ligando ao componente reativo do radical. O óxido nítrico, também produzido pela maioria das categorias celulares, reage com os radicais livres produzindo peroxinitrito que age diretamente no colesterol de membrana causando injúrias a esta estrutura. Esse flavonoide tem alta capacidade de bloqueio da reação óxido nítrico-radicaís livres, o que diminui a chance de danos às membranas celulares (Volp, 2008).

Estudos conduzidos por Freitas (2015) não identificaram ação benéfica da antocianina na criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. Pinho e colaboradores (2014) também não observaram vantagem na utilização desse flavonoide na criopreservação de sêmen suíno, sugerindo novos estudos para determinação da melhor concentração a ser utilizada.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Viçosa- UFV (proc.76/2015) e conduzido no Setor de Equideocultura da UFV, Central de Transferência de Embriões CrioHorse, Haras Maré Mansa e Haras 2L.

Foram utilizados seis garanhões da raça Mangalarga Marchador (MM), com idade entre 4 e 10 anos, saudáveis e aprovados para reprodução. As colheitas foram realizadas entre os meses de novembro e janeiro de 2015, coincidindo com o período de estação de monta desses animais. Os garanhões permaneceram alojados em baía de alvenaria (25 m²) durante meio período do dia, sendo soltos em piquete com vegetação predominante de Tifton85 (*Cynodon* spp) no restante do tempo. A alimentação fornecida em cocho foi silagem de milho e capim Tanzânia (*Panicum* sp.) picado, tendo água ad libitum.

3.1. Delineamento experimental

O presente estudo foi dividido em duas etapas. A primeira teve por objetivo a comparação de três concentrações de etilenoglicol, dimetilformamida e antocianina, bem como duas concentrações da associação dos crioprotetores etilenoglicol e dimetilformamida. A segunda etapa teve por objetivo inferir dentre os crioprotetores e associações destes, qual diluente teria o melhor resultadado de viabilidade espermática sob análises *in vitro*.

Na primeira etapa, foram utilizados cinco ejaculados de um garanhão da raça Mangalarga Marchador, de aproximadamente sete anos de idade e proveniente do Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. O animal foi submetido ao exame andrológico e considerado apto à reprodução, de acordo com os padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para a espécie equina (CBRA, 2013). O objetivo desta etapa foi definir a melhor concentração dos crioprotetores e do antioxidante a ser utilizada nas fases seguintes deste experimento, e conseqüentemente aferir sobre a melhor concentração, dentre as estudadas, para proceder a criopreservação de sêmen. O congelamento das amostras se deu de acordo com o critério a seguir descrito:

- O meio base de congelamento utilizado foi o Botucurio® (Botupharma) sem crioprotetor;
- Etilenoglicol (E): 4, 5 e 6%;
- Dimetilformamida (D): 4, 5 e 6%;
- Etilenoglicol + Dimetilformamida (ED): 1:4 e 2:3 (%)
- Antocianina (A): O antioxidante foi utilizado em três tratamentos nos volumes de 0,5, 1,5 e 9µL para cada 100 milhões de espermatozoides.

O meio base de congelamento utilizado para os tratamentos à base de antocianina foi o Botucurio® (Botupharma) convencional (1% glicerol e 4% metilformamida).

O sêmen descongelado a 37°C por 30 segundos foi avaliado com auxílio microscópio de luz quanto aos aspectos físicos de motilidade espermática progressiva total e vigor espermático.

Na segunda etapa foram utilizados cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade entre quatro e 10 anos, mantidos na Central de transferência de Embriões CrioHorse, do Haras Maré Mansa e Haras 2L, em São José do Goiabal –

MG. Latitude 19° 55' 43'' Sul, Longitude 42° 42' 4'' Oeste. Todos os animais foram submetidos ao exame andrológico e considerados aptos à reprodução, de acordo com os padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para a espécie equina (CBRA, 2013).

Os melhores tratamentos encontrados na primeira fase foram empregados nesta etapa, sendo comparados aqui, os diluidores e não as diluições, da seguinte maneira:

- Tratamento Controle- glicerol 1% metilformamida 4% (B) - (Botucurio®)
- Tratamento 1 (E) – Etilenoglicol 5%
- Tratamento 2 (D) – Dimetilformamida 4%
- Tratamento 3 (ED) – Etilenoglicol 1% + Dimetilformamida 4%
- Tratamento 4 (BA) - Botucurio® + Antocianina (0,5µL/100 x 10⁶ espermatozoides)
- Tratamento 5 (EA) – Etilenoglicol 4% + Antocianina (0,5µL/100 x 10⁶ espermatozoides)
- Tratamento 6 (DA) – Dimetilformamida 5% + Antocianina (0,5µL/100 x 10⁶ espermatozoides)
- Tratamento 7(EDA) – Etilenoglicol 1% + Dimetilformamida 4% + Antocianina (0,5µL/100 x 10⁶ espermatozoides)

As coletas foram realizadas em intervalos de dois dias, perfazendo cinco ejaculados/garanhão analisados no período experimental, totalizando 5 coletas na primeira etapa e 25 coletas na segunda etapa.

Ejaculados que apresentaram motilidade espermática total inferior a 65% na avaliação do sêmen fresco foram descartados.

3.2. Coleta do Sêmen

Todos os animais tiveram suas reservas extra-gonádicas esgotadas por meio de coletas consecutivas durante cinco dias (Stichet al., 2002). Após dois dias de descanso sexual, foram iniciadas as coletas para avaliação e congelamento.

As coletas de sêmen foram realizadas com auxílio de vagina artificial, modelo Botucatu, preenchida previamente com água aquecida a 45°C. O sêmen foi coletado em saco plástico revestindo internamente o copo coletor, sendo este protegido da luz e oscilações de temperatura por proteção de material isolante. Éguas em estro natural ou

induzido com ciprionato de estradiol (E.C.P.[®] 0,5 mg/kg) ou manequim foram utilizados para monta dos ganhões.

3.3. Criopreservação do Sêmen

O sêmen recém-coletado foi separado em alíquotas iguais, em tubos Falcon de 15 mL e centrifugado a 600 G por 10 minutos. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e a ressuspensão do pellet foi feita com os diluentes preparados para cada tratamento. O volume final dessa ressuspensão foi calculado de forma a se obter 100×10^6 espermatozoides/mL. Para envase, foram utilizadas palhetas de 0,5 mL identificadas com o nome do ganhão, partida e tratamento, tendo estas sido lacradas com álcool polivinílico.

O sêmen envasado foi resfriado em geladeira e estabilizado por 20 minutos a 5°C. Terminado este período, as palhetas foram acondicionadas em “rampa de congelamento” permanecendo a 5 cm da lâmina de nitrogênio líquido, por um período de 15 minutos. Posteriormente, as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão criogênico a -196 °C (Terraciano et al., 2008).

As etapas descritas acima podem ser analisadas de forma resumida na Figura 1.

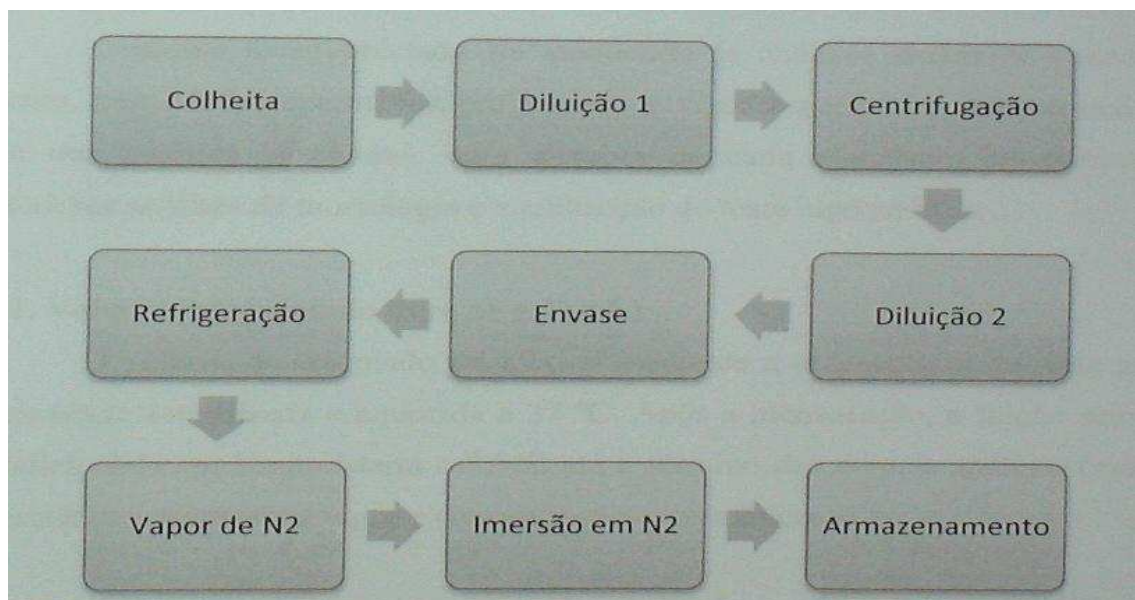


Figura 1. Fluxograma do congelamento de sêmen. Diluição 1: Botusêmen®; Diluição 2: diluente de congelamento (tratamentos); N2: Nitrogênio a -196°C.

3.4. Extração da antocianina

A extração da antocianina foi realizada no Laboratório de Pigmentos Naturais e Secagem do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. A extração do pigmento foi feita de acordo com Silva (2011), de forma que 500 g de polpa de açaí congelada foram misturados a 80mL de solvente extrator (Etanol-Água (70:30) e HCl suficiente para ajustar o pH do meio para 2,0. A mistura permaneceu em repouso por 24 horas a 5°C, ao abrigo da luz. Após esse período foi realizada uma prensa manual em filtro de tecido, a fim de reter o resíduo. O extrato foi transferido para balão volumétrico de 100 mL tendo seu volume completado com o solvente extrator, formando o extrato concentrado (EC).

O conteúdo do balão foi centrifugado a 300 G por 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado em papel Whatman nº 1. Após a filtração, o extrato foi purificado em três extrações sucessivas. O método de pH único consiste da transferência quantitativa de uma alíquota do extrato concentrado para balão volumétrico de 10 mL , tendo o volume completado com solução Etanol 95%– HCl 1,5N (85/15) formando dessa maneira, o extrato diluído.

3.5. Análise do sêmen fresco

O sêmen recém-coletado foi submetido às análises físicas de concentração, volume, motilidade espermática progressiva e vigor espermático. Na segunda etapa, além das análises já citadas, uma alíquota de cada ejaculado foi utilizada para posteriores análises de morfologia e a realização do teste hiposmótico.

3.5.1. Volume do ejaculado livre de gel (mL)

O volume do ejaculado foi aferido mediante a utilização de proveta graduada previamente esterilizada e aquecida a 37°C. Após a mensuração, a fração sem gel foi acondicionada em banho Maria a 37°C até o término das demais análises (motilidade espermática progressiva, vigor e concentração espermáticos).

3.5.2. Motilidade espermática progressiva e vigor espermático

Para esta análise, uma amostra de 20 µL de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas em mesa térmica a 37°C. A análise foi realizada em microscopia de luz em aumento de 100x, sendo observados pelo menos cinco campos microscópicos. A motilidade espermática progressiva foi classificada de 0-100% de espermatozoides

móveis e o vigor espermático classificado em escore de 0-5, sendo 0, ausência de movimento e 5 mais de 90% das células móveis se locomovendo de forma progressiva (Johnston et al., 2001).

3.5.3. Concentração espermática

Esta análise foi realizada a partir de uma alíquota de 10 μ L de sêmen diluída em 990 μ L de formol salina tamponado (proporção de 1:100). Após homogeneização, uma amostra foi colocada em cada um dos retículos da câmara de Neubauer. A contagem foi realizada em microscópio óptico em aumento de 200x. A concentração espermática total foi obtida pela multiplicação da concentração espermática por mL pelo volume de sêmen total livre de gel, como preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013).

3.5.4. Teste Hiposmótico

Uma amostra de 100 μ L de sêmen foi adicionada em 800 μ L de água destilada pré-aquecida a 37°C e a solução foi incubada nesta temperatura por 15 minutos. Após esse tempo, foi feita a fixação das células por meio do acréscimo de 0,5 mL de formol salina tamponado. As avaliações foram feitas seguindo a metodologia de preparação úmida, adicionando-se uma gota de 20 μ L da amostra entre lâmina e lamínula e contabilizando 200 células em microscopia óptica com contraste de fase sob óleo de imersão e aumento de 1000x. Todas as células apresentando dobra ou enrolamento de cauda foram consideradas reativas ao teste, ou seja, espermatozoides normais. Os valores obtidos neste teste não foram corrigidos pelo percentual de caldas dobradas encontrados no teste de morfologia.

3.5.5. Morfologia Espermática

Para a morfologia espermática foram adicionados em tubos plásticos de 1,5 mL (Eppendorf®) 1 mL de solução formol salina tamponada, 100 μ L de sêmen ou quantidade suficiente para turvar a mesma. A análise foi realizada pelo método de preparação úmida baseando-se na quantificação das patologias segundo classificação de Blom (1973) e preconizadas pelo CBRA (2013), em defeitos maiores, menores e defeitos totais em um total de 200 células espermáticas contabilizadas por meio de microscopia óptica em contraste de fase com aumento de 1000x, sob óleo de imersão.

3.6. Análise do sêmen pós-descongelamento

As análises descritas a seguir foram utilizadas apenas na segunda etapa do experimento.

3.6.1. Teste de termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência consiste em avaliar o sêmen quanto ao tempo de viabilidade pós-descongelamento à temperatura de incubação (37 °C por 90 minutos) próxima à temperatura intra-uterina. Este teste foi realizado mediante avaliações de motilidade espermática total (0 a 100) e vigor espermático (0 a 5) em microscópio óptico, nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos após o descongelamento. Para tal procedimento, as palhetas foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e o sêmen permaneceu incubado em tubos plásticos de 1,5 mL (Eppendofs®) durante o período do teste.

3.6.2. Citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo das amostras foi realizada em aparelho BD FACSVerser™ 5, equipado com laser de argônio (azul – 488 nm de emissão com 20 mW de potência), laser UV (vermelho – 640 nm de emissão com 40 mW de potência) e filtros A (LongPass 507 nm / Band Pass 527/32 nm), B (LP 560 nm / BP 568/42 nm), C (LP 665 nm / BP 700/54 nm), D (LP 752 nm / BP 783/56 nm), E (LP 660 nm / BP 660/10 nm) e F (LP 752 nm / BP 783/56 nm).

A “calibragem” do citômetro foi necessária para obtenção de um padrão a ser utilizado para a espécie e tipo celular em questão. Este padrão foi estipulado empregando amostras não marcadas com sondas para localização da população das células desejadas e em seguida com amostras coradas individualmente com as sondas isoladas a fim de identificar a população marcada, para que se efetuasse a coerência dos dados obtidos pelo equipamento com os previamente conhecidos sobre a viabilidade do sêmen utilizado. Para tanto, foram utilizadas amostras de sêmen resfriado de garanhão de fertilidade comprovada, diluídas em PBS para obter a concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL. A população de interesse foi marcada com iodeto de propídeo (IP), a fim de separar partículas não espermáticas ou com características de dispersão semelhantes às dos espermatozoides, porém com conteúdo de DNA diferenciado (Freitaset al., 2015).

3.6.2.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (sondas IP/FITC-PSA)

A integridade da membrana plasmática espermática foi avaliada por meio da sonda iodeto de propídeo (IP), sonda impermeável à membrana, que cora o núcleo celular em vermelho quando a mesma encontra-se lesionada (Matyuset al., 1984). Para avaliação da integridade acrossomal foi utilizada a aglutinina *Pisum sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), sonda incapaz de penetrar a membrana acrossomal intacta, corando em verde somente aqueles espermatozoides que apresentam lesão de acrossoma (CROSS et al., 1986), reação ocasionada pela ligação às moléculas de α -manose presentes na matriz acrossomal (Celegniet al., 2007). A apresentação do resultado pode ser vista na Figura 2.

Para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal foi seguido o protocolo proposto por Oliveira et al. (2012) modificado por Freitas (2015). Uma alíquota de 150 μ L de sêmen diluído em PBS (5×10^6 espermatozoides/mL) foi incubada com 10 μ L de FITC-PSA (100 μ g/mL) e 3 μ L de IP (0,5 mg/mL) em microtubos plásticos (2 mL) dispostos em banho Maria a 37 °C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 μ L de PBS levando à leitura no aparelho de citometria. Todas as amostras tiveram 10.000 células analisadas, em uma taxa de aproximadamente 200 células/segundo, nos filtros A (FITC-PSA, lesão acrossomal) e C (IP, lesão de membrana plasmática).

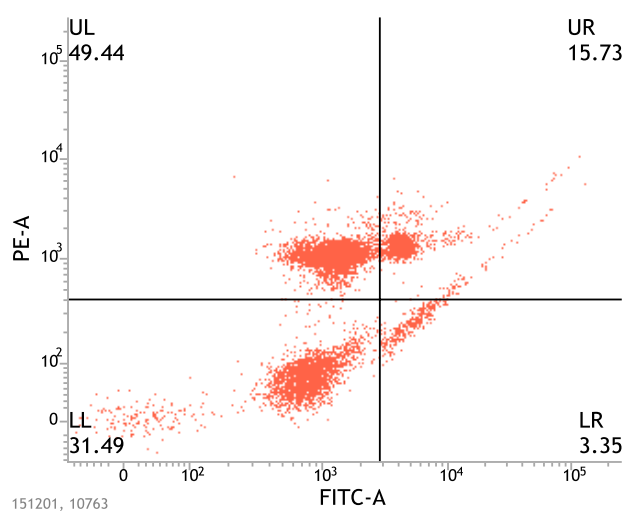


Figura 2. Gráfico de pontos obtido em citômetro de fluxo para amostra de células espermáticas de garanhão Mangalarga Marchador coradas com as sondas FITC-PSA e IP. Descrição dos quadrantes: LL: IP-/FITC- (espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras); LR: IP-/FITC+ (espermatozoides com acrossoma lesionado); UL: IP+/FITC- (espermatozoides com membrana plasmática lesionada); UR: IP+/FITC+ (espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionada).

3.6.2.2. Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular (sondas DCFDA/IP)

A produção de peróxido de hidrogênio intracelular foi avaliada com auxílio do diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFDA) que emite fluorescência verde ao penetrar na célula e ser oxidado pelo peróxido de hidrogênio intracelular.

Para esta análise, adotou-se o seguinte protocolo: Uma alíquota de 500 μL da amostra diluída em meio PBS (5×10^6 espermatozoides/mL) foi adicionada a um microtubo (2,0 mL) aquecido em banho Maria a 37°C , e corada com 0,5 μL DCFDA (1 mg/mL) durante 30 minutos. Após esse período, 150 μL da amostra foi corada com 3 μL de IP, permanecendo incubada por mais 5 minutos. Em seguida, 150 μL de PBS foram adicionados à amostra para realização da leitura no aparelho (Macías-García et al., 2012). Foram contabilizadas 10.000 células, em uma taxa de 400 células/segundo, com os filtros A (CFDA oxidado) e C (IP, membrana plasmática lesionada) e excitação de 488 nm. O resultado pôde ser avaliado em gráficos de acordo com a Figura 3.

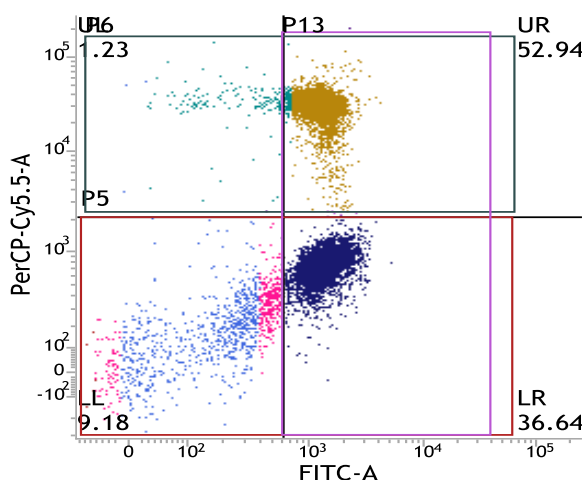


Figura 3. Gráfico de pontos obtido em citômetro de fluxo para amostra de células espermáticas de garanhão Mangalarga Marchador coradas com as sondas DCFDA e IP. Quadrantes: LL: IP-/DCFDA- (espermatozoides com membrana íntegra sem peróxido de hidrogênio intracelular); LR: IP-/DCFDA+ (espermatozoides com membrana íntegra e presença peróxido de hidrogênio intracelular); UL: IP+/DCFDA- (espermatozoides lesionados sem peróxido de hidrogênio intracelular); UR: IP+/DCFDA+ (espermatozoides lesionados com peróxido de hidrogênio intracelular).

3.6.2.3. Avaliação da organização da bicamada lipídica (sondas M540/ IP)

A organização da bicamada lipídica foi avaliada mediante a utilização da sondamerocianina (M540). A M540 é uma sonda lipofílica (Eastonet al., 1978) com alta afinidade por membranas instáveis (Payan-Carreira et al., 2013) utilizada para detectar a desorganização fosfolipídica na camada externa da bicamada da membrana plasmática (Langner & Hui, 1993) e conseqüentemente o aumento da fluidez desta (Partyka et al., 2012). Para análise da estabilidade da membrana plasmática, uma alíquota de 150 µL do sêmen diluído em meio PBS (5×10^6 espermatozoides/mL) foi adicionada a um microtubo (2,0 mL) aquecido em banho Maria a 37 °C, e corada com 0,5 µL M540 (0,5 mg/mL) e 3 µL de IP durante 15 minutos, a fim de contabilizar a desorganização de membrana a partir das células com membrana íntegra, como uma tentativa de identificar células em processo de capacitação. Após esse período foi adicionado 150 µL de PBS aquecido a 37°C à amostra, que seguiu então para leitura no aparelho. Foram contabilizadas 10.000 células, em uma taxa de 400 células/segundo, com os filtros B (M540, desorganização de membrana) e C (IP, integridade de membrana) e excitação de 488 nm.

Em todas as amostras, a porcentagem de células com alta ou baixa desorganização de membrana, foi quantificada a partir do número de células viáveis. Cada amostra deu origem a um gráfico semelhante ao exposto na Figura 4.

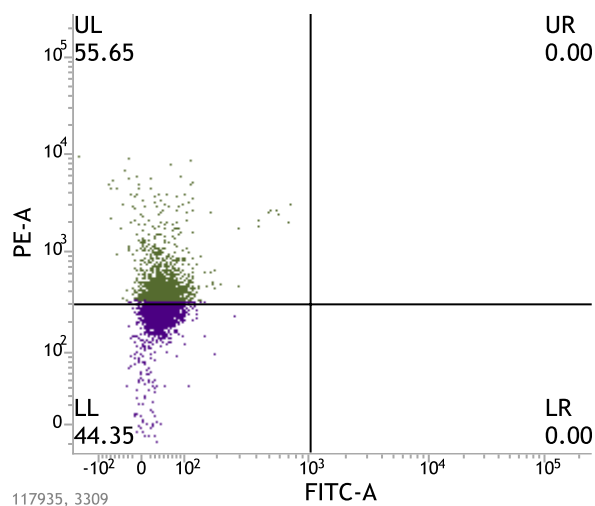


Figura 4. Gráfico de pontos obtido em citômetro de fluxo para amostra de células espermáticas com membrana íntegra de garanhão Mangalarga Marchador coradas com a sonda M540, permitindo a classificação em membrana organizada (LL) e desorganizada (UL).

3.6.2.4. Avaliação do potencial mitocondrial (sonda JC-1)

O potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) espermático foi avaliado mediante a utilização da sonda JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina). Essa sonda é um fluorocromo lipofílico que se acumula na mitocôndria de acordo com seu potencial de membrana. A fluorescência verde é característica da forma monomérica, que se acumula somente na mitocôndria despolarizada, com baixo potencial transmembrana ($\Delta\Psi_m < 80-100$ mV). Quando o $\Delta\Psi_m$ encontra-se acima de 80-100 mV, a fluorescência é emitida em laranja, em função da formação dos agregados de JC-1 na mitocôndria polarizada (Frackzek et al., 2012). A análise do potencial mitocondrial foi determinada de acordo com protocolo proposto por Ortega-Ferrusola et al. (2010) modificado por Freitas et al. (2015). Uma alíquota de 500 μL de cada amostra previamente diluída em meio PBS (5×10^6 espermatozoides/mL) foi incubada com 0,5 μL JC-1 (153 μM ; anexo A) por 40 minutos em banho Maria a 37 °C e posteriormente encaminhada para análise por citometria de fluxo.

Foram analisadas 30.000 células por amostra, em uma taxa de aproximadamente 200 células/segundo, com os filtros A (JC-1 monômeros) e B (JC-1 agregados) e excitação de 488 nm.

As células foram classificadas em alto e baixo potencial mitocondrial de acordo com a posição gráfica ajustada no aparelho como mostrado na Figura 5.

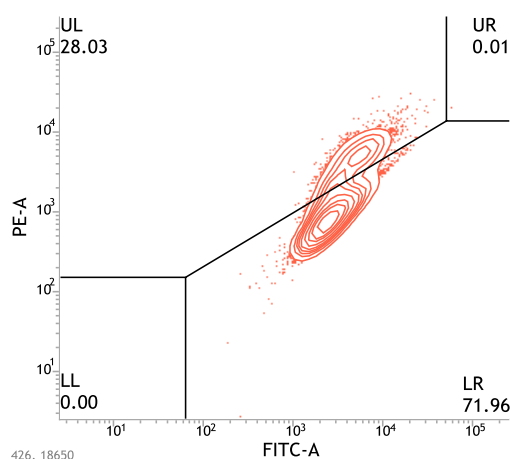


Figura 5. Gráfico de contorno obtido em citômetro de fluxo para amostra de células espermáticas de garanhão Mangalarga Marchador coradas com as sondas JC-1, podendo ser divididas em alto (UL) e baixo potencial mitocondrial (LR).

3.7. Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado de acordo com o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = D_i + A_j + (DA)_{ij} + e_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} = resposta observada; D_i = efeito referente ao diluente i ; A_j = efeito referente ao animal j ; $(DA)_{ij}$ = interação; e_{ijk} = erro aleatório.

Os dados foram submetidos à análise de variância (PROC GLM; SAS, 2002), a comparação das médias dos tratamentos foi realizada pelo teste t , e probabilidade de erro de 5 %.

PARTE I

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CRIOPROTETORES E DE ANTOCIANINA SOBRE O CONGELAMENTO DE SEMEN DE GARANHÃO DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios registrados nos dos tratamentos à base de dimetilformamida nas concentrações de 4, 5 e 6 % foram respectivamente 53,3; 38,3 e 42,5% para motilidade espermática progressiva e 2,3; 2,2 e 2,1 para vigor espermático. O etilenoglicol nas mesmas concentrações apresentou os seguintes resultados para motilidade espermática progressiva: 25, 27 e 11,7%, enquanto o vigor ficou em 2,4; 2,2 e 1,4. A associação desses dois crioprotetores nas concentrações de 1% de etilenoglicol + 4% de dimetilformamida e 2% de etilenoglicol + 3% de dimetilformamida tiveram os seguintes resultados respectivamente: 62,5 e 52,5% para motilidade espermática progressiva e 2,3 para vigor em ambos os casos (Tabela 1).

Os diluentes acrescidos de antocianina tiveram média de motilidade espermática progressiva ao descongelamento de 50% para a concentração de $0,5\mu\text{L}/100 \times 10^6$ espermatozoides, 40,8% de motilidade espermática para $1,5 \mu\text{L}/100 \times 10^6$ células e 11,7% de motilidade espermática para $9\mu\text{L}/100 \times 10^6$ espermatozoides.

Os valores médios obtidos para os aspectos físicos do sêmen pós-descongelamento e criopreservados em diluentes com diferentes concentrações de dimetilformamida, etilenoglicol e etilenoglicol combinado com dimetilformamida não apresentaram diferença entre si ($P>0,05$) quanto à motilidade espermática progressiva e vigor espermático dentro de cada tratamento. Embora trabalhos tenha sido conduzidos utilizando concentrações de etilenoglicol e glicerol até 5% (Squires et al., 2004; Vidament et al., 2005; Gibb et al., 2013), nota-se que concentrações menores desses álcoois e a associação desses a amidas, tem apresentado valores médios de aspectos físicos ao descongelamento melhores (Squires et al., 2004.; Alvarenga et al., 2005; Freitas, 2015); que os diluentes que empregam estes crioprotetores puros. Em 2012, Macias-Garcia chegou a inferir que o glicerol não deve ser utilizado de forma alguma em concentrações acima de 2,5% do volume total do diluente de congelamento.

Em relação às concentrações de antocianina, observou-se grande desvantagem da concentração de 9µL comparada às demais estudadas (Tabela 1).

Não foi possível determinar uma concentração máxima ou mínima de antocianina que pode ser adicionada aos diluentes sem que haja danificação celular ou mesmo se há efeito benéfico do antioxidante adicionado aos diluentes nos tratamentos 4.1 e 4.2, uma vez que, não houve melhora nos aspectos físicos do sêmen quando comparado aos outros tratamentos e não foi realizada comparação com o diluente Botucricio sem adição de antocianina, que funcionaria como tratamento controle.

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão para os aspectos físicos do sêmen pós-descongelamento de garanhão da raça Mangalarga Machador, criopreservado em diferentes diluentes de congelamento.

Crioprotetor	Tratamentos	Aspectos físicos pós-descongelamento	
		Motilidade	Vigor
Dimetilformamida	4%	53,3±16,6a	2,3±0,3a
	5%	38,3±20,7a	2,2±0,3a
	6%	42,5±22,3a	2,1±0,4a
	Média	44,7±19,9AB	2,2±0,3A
Etilenoglicol	4%	25,0±13,8a	2,4±0,4a
	5%	27,0±15,4a	2,2±0,4a
	6%	11,7±11,7a	1,4±1,1a
	Média	21,4±14,7C	2,0±0,8A
Etilenoglicol +Dimetilformamida	1:4	62,5±12,5a	2,3±0,3a
	2:3	52,5±14,0a	2,3±0,3a
	Média	57,5±13,7A	2,3±0,2A
Antocianina	0,5	50,0±19,0a	2,4±0,4a
	1,5	40,8±15,6a	2,3±0,3a
	9	11,7±9,8b	1,1±0,7b
	Média	34,2±22,1B	1,9±0,8A

Valores médios seguidos por letras maiúsculas e médias de tratamentos seguidas por letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelos testes de Duncan ou Kruskal Wallis ou Wilcoxon; TRAT 0,5 : Antocianina 0,5µL/100 x 10⁶ espermatozoides; TRAT 1,5: Antocianina 1,5µL/100 x 10⁶ espermatozoides; TRAT 9: Antocianina 9 µL/100 x 10⁶ espermatozoides.

Freitas (2015) não encontrou resultados que beneficiassem a antocianina ao utilizar uma concentração de 0,25% do antioxidante sobre o volume do diluente de

congelamento de garanhões Mangalarga Marchador. Devido à produção de peróxido de hidrogênio estar diretamente ligada à quantidade de células espermáticas presentes no meio (Guthrie&Welch, 2012), o ajuste de um antioxidante para volume e não para concentração de células pode ser errôneo. Utilizando 20 µL de solução de antocianina para 100×10^6 espermatozoides, em diferentes etapas do congelamento de sêmen de suínos, Pinho et al. (2012) também não observaram melhora nos resultados quando comparado ao grupo controle sem antocianina.

Os melhores valores médios de motilidade espermática progressiva e vigor espermático dentre os quatro tratamentos estudados foram obtidos no tratamento ED, mostrando que a dimetilformamida pode melhorar o meio crioprotetor. Contudo, a exclusão do tratamento 4.3 (antocianina 9µL) poderia alterar as análises comparativas entre os tratamentos. Vale ressaltar que esta primeira etapa do experimento não teve como objetivo a comparação entre os diluentes e sim determinar a melhor concentração dos crioprotetores em questão.

CONCLUSÕES

O etilenoglicol e a dimetilformamida podem ser usados isoladamente nas concentrações de 4, 5 e 6% ou em associações entre si, nas proporções de 1:4 ou 2:3, totalizando concentração final de crioprotetores de 5 %, sem grandes modificações nos valores médios de motilidade espermática progressiva e vigor espermático após a criopreservação.

A antocianina, da forma como foi extraída neste experimento, não deve ser utilizada em concentrações acima de 9µL/100 x 10^6 espermatozoides, sob pena de queda abrupta na motilidade espermática e inadequação do meio para criopreservação de sêmen de equinos da raça Mangalarga Marchador.

PARTE II

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR EM DILUIDORES COM DIFERENTES MEIOS CRIOPROTETORES ASSOCIADOS OU NÃO À ANTOCIANINA

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais se mostraram dentro dos parâmetros preconizados pelo CBRA (2014) para garanhões aptos à reprodução segundo análises de volume, motilidade, vigor e concentração realizadas imediatamente após as colheitas.

Ao correlacionar os valores médios encontrados no teste hiposmótico (não corrigido pelo teste de morfologia) com os resultados obtidos em citometria de fluxo para membrana lesionada, torna-se visível que o processo de criopreservação reduziu expressivamente a porcentagem de membranas íntegras em todos os tratamentos, o que comprova o quão agressivo este processo pode ser às células espermáticas (Amann e Graham, 1992; Holt, 2000; Jobim et al., 2011; Lemma, 2011).

Tabela 2. Média e desvios-padrão dos parâmetros seminais do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Animal	Volume (mL)	Motilidade (%)	Vigor	Concentração inicial (10^6 /mL)	Hiposmótico (%)
1	37± 4,0	81± 3,7	3,1± 0,4	187±34,4	79,2± 2,1
2	41± 26,9	82± 4	3,1± 0,2	193± 48,3	71,4± 5,5
3	42± 6,8	83± 2,4	3,3± 0,2	282± 41,1	84,4± 5,5
4	26± 5,8	84± 2,0	3,4± 0,2	187± 37,3	78± 2,0
5	34± 15,2	83± 2,4	3,2± 0,2	163± 40,4	73,25± 3,8

As avaliações de motilidade e vigor espermático imediatamente após o descongelamento a 37°C, mostraram equivalência dos tratamentos ($p > 0,05$), exceto pela inferioridade apresentada pelo etilenoglicol em E e EA ($p < 0,05$) (Tabela 3). No entanto, ao decorrer do tempo do teste de termorresistência (TTR), já nos primeiros 30 minutos, os valores médios registrados no tratamento controle mostraram-se melhores

em relação aos valores médios obtidos em outros tratamentos estudados, sendo que o tratamento E e EA sempre apresentaram os piores valores médios para motilidade espermática progressiva e vigor espermático (Tabelas 3 e 4). Os tratamentos que empregaram a dimetilformamida associada ou não, apresentaram valores similares entre si ($p > 0,05$).

Tabela 3. Médias \pm desvios-padrão dos valores de motilidade espermática progressiva (%) e vigor espermático após o descongelamento (T0) e 30 minutos após (T30) de sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador, utilizando diferentes crioprotetores e um antioxidante.

TRAT	TTRT0		TTRT30	
	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor
B	50,2 \pm 12,0 a	2,8 \pm 0,4 a	36,0 \pm 11,2 a	2,6 \pm 0,3 a
BA	48,4 \pm 11,7 a	2,7 \pm 0,4 ab	34,4 \pm 13,7a	2,4 \pm 0,6 a
D	54,2 \pm 12,4a	2,4 \pm 0,4 b	24,4 \pm 17,6b	1,5 \pm 1,0 b
DA	50,2 \pm 16,5a	2,5 \pm 0,5 ab	26,2 \pm 21,6b	1,6 \pm 1,0 b
E	20,8 \pm 11,1b	2,2 \pm 0,5 ab	7,1 \pm 8,8c	0,8 \pm 0,9 c
EA	17,6 \pm 11,3 b	1,8 \pm 0,8 c	7,7 \pm 9,6c	0,8 \pm 0,9 c
ED	48,2 \pm 16,1 a	2,5 \pm 0,6 ab	25,4 \pm 18,4b	1,8 \pm 0,8 b
EDA	48,6 \pm 19,8a	2,4 \pm 0,8 ab	28,0 \pm 17,6ab	1,8 \pm 1,0 b

Na mesma coluna, letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste t; TTR: teste de termorresistência; T0: imediatamente após o descongelamento; T30: 30 minutos pós-descongelamento; TRAT: Tratamento B: Botucurio; BA: Botucurio + Antocianina; D: Dimetilformamida; DA: Dimetilformamida + Antocianina; E: Etilenoglicol; EA: Etilenoglicol + Antocianina; ED: Etilenoglicol + Dimetilformamida; EDA: Etilenoglicol + Dimetilformamida + Antocianina.

Ao descongelamento, nos tratamentos E e EA verificou-se motilidade espermática progressiva e vigor espermático inferiores ($p < 0,05$), aproximadamente 30% menores que em outros tratamentos, o que indica que o crioprotetor etilenoglicol não deve ser utilizado sozinho em concentrações acima de 4%, como observado por Bittencourt et al. (2004). O etilenoglicol, embora penetre a membrana plasmática mais rápido que o glicerol, é mais lento em relação às amidas (Phelpset al., 1999), podendo ser esse o motivo da sua ineficiência em protocolos de congelamento com resfriamento rápido, como neste experimento. No entanto, sua associação com a dimetilformamida (ED e EDA) se mostrou satisfatória. Álcoois e amidas associados como crioprotetores aos diluentes de congelamento têm demonstrado grande eficiência principalmente na diminuição do estresse osmótico e consequente lesão celular ou alterações na

motilidade espermática progressiva de amostras de sêmen em várias espécies domésticas (Squires et al., 2004; Alvarenga et al., 2005; Oliveira et al., 2010).

Tabela 4. Médias e desvios-padrão da motilidade espermática progressiva (%) e vigor espermático avaliados 60 e 90 minutos após o descongelamento das amostras de sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador, utilizando diferentes crioprotetores e um antioxidante.

TRAT	TTRT60		TTRT90	
	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor
B	21,6± 12,9 a	1,8± 0,9 a	12,4± 11,0 a	1,3± 1,0 a
BA	21,0± 12,6 a	1,8± 0,8 a	13,0± 13,2 a	1,2± 1,0 a
D	9,4± 11,7 b	0,9± 1,0 b	2,4± 6,6 c	0,2± 0,6 bc
DA	11,0± 15,0 b	0,9± 1,0 b	5,2± 10,9 bcd	0,5± 0,9 b
E	2,5± 5,1 c	0,3± 0,6 c	0,4± 2,0 d	0,1± 0,3 c
EA	2,2± 5,5 c	0,2± 0,6 c	0± 0 d	0± 0 c
ED	13,6± 15,2 b	1,0± 1,0 b	9,2± 12,0 ab	0,8± 1,0 b
EDA	13,2± 15,3 b	0,9± 1,0 b	6,0± 11,0 bc	0,5± 0,8 b

Na mesma coluna, letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0.05$) pelo teste t; TTR: teste de termorresistência; T60: 60 minutos pós descongelamento; T90: 90 minutos pós-descongelamento; TRAT: Tratamento B: Botucurio; BA: Botucurio +Antocianina; D: Dimetilformamida; DA: Dimetilformamida + Antocianina; E: Etilenoglicol; EA: Etilenoglicol + Antocianina; ED: Etilenoglicol + Dimetilformamida; EDA: Etilenoglicol + Dimetilformamida + Antocianina.

Apesar da maior porcentagem numérica de células com alto potencial mitocondrial nos tratamentos B (11,3%), BA (9,7%), D (8,1%) e DA (8,2%), apresentados na Tabela 5, não pode-se inferir que esses grupos apresentem maior capacidade de movimentação celular em relação aos demais tratamentos, não havendo portanto, correlação direta desses valores com os encontrados para motilidade e vigor no teste de termorresistência.

O resultado observado no teste de termorresistência corrobora com os valores obtidos nas análises por citometria de fluxo para as amostras coradas com a sonda JC-1, que mostrou maior potencial mitocondrial do sêmen congelado com o Botucurio (11,3%), sendo que as amostras E e EA também apresentaram pior condição de atividade mitocondrial ($p < 0,05$). Esses resultados reforçamos verificados por Freitas (2015) ao comparar os crioprotetores glicerol 5%, dimetilformamida 5% e a associação de ambos, tendo os piores resultados para o tratamento empregando o glicerol puro. Madeira e colaboradores (2013) relataram maior percentual de espermatozoides móveis em diluente de congelamento de sêmen bovino que tinha como crioprotetor o glicerol

quando comparado à dimetilformamida, no entanto, ao quantificar as lesões morfológicas proporcionadas por ambos os tratamentos, esses valores se inverteram, tendo vantagem neste aspecto, o tratamento que tinha como crioprotetor a dimetilformamida.

Tabela 5. Médias e desvios-padrão (%) de atividade mitocondrial de sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador utilizando diferentes crioprotetores e um antioxidante.

Tratamento	Baixo potencial mitocondrial	Alto potencial mitocondrial
B	88,4 ± 8,2 c	11,3 ± 8,1 a
BA	90,1 ± 8,4 bc	9,7 ± 8,4 ab
D	91,6 ± 8,6 abc	8,1 ± 8,6 abc
DA	91,5 ± 8,3 abc	8,2 ± 8,2 abc
E	94,2 ± 3,6a	5,6 ± 3,5 c
EA	92,7 ± 7,0 ab	7,0 ± 7,0 bc
ED	94,1 ± 4,7 a	5,6 ± 4,6 c
EDA	93,5 ± 4,8 ab	6,2 ± 4,7 bc

Valores médios seguidos por letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0.05$) pelo teste de Duncan; B: Botucurio; BA: Botucurio + Antocianina; D: Dimetilformamida; DA: Dimetilformamida + Antocianina; E: Etilenoglicol; EA: Etilenoglicol + Antocianina; ED: Etilenoglicol + Dimetilformamida; EDA: Etilenoglicol + Dimetilformamida + Antocianina.

A queda acentuada de motilidade espermática progressiva e vigor espermático nos tratamentos contendo dimetilformamida (aproximadamente 50% na motilidade nos primeiros 30 minutos) poderia ser explicada pela maior quantidade de ROS pelas células viáveis submetidas a esse tratamento (Tabela 7), indicando alto metabolismo ou capacitação dos espermatozoides (Aurich, 2005), o que pode não ser desejável no tempo analisado, uma vez que o processo de capacitação deve ocorrer na tuba uterina, no momento mais próximo da fecundação sob pena de perder a viabilidade espermática antes de penetrar a zona pelúcida (Burnaugh, 2007). Por outro lado, ao avaliar a produção de peróxido de hidrogênio isoladamente, é possível perceber que todos os tratamentos respondem de forma semelhante ($p > 0,05$), ou seja, produzem o mesmo percentual desta ROS (Tabela 6).

A liberação de peróxido de hidrogênio é um processo natural ocasionado pelo metabolismo das células espermáticas, no entanto quando em excesso pode ser danoso à membrana espermática e estrutura do DNA celular. Espermatozoides mortos tendem a liberar ainda mais peróxido de hidrogênio, que pode agir prejudicando as células viáveis

aconditionadas no mesmo ambiente (Baumberet al., 2003; Dona et al., 2011). Por este motivo, o sêmen acondicionado em palhetas ou recipientes em pequeno volume e alta concentração tende a perder rapidamente sua viabilidade, dados esses possível de serem averiguados pelo teste de termorresistência realizado neste estudo, apesar de a concentração aqui utilizada ainda estar abaixo da utilizada nas centrais de congelamento de sêmen.

Tabela 6. Médias e desvios-padrão de produção de peróxido de hidrogênio nas amostras de sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador utilizando diferentes crioprotetores e um antioxidante e incubadas a 37°C por 30 minutos com a sonda DCFDA e avaliadas em citômetro de fluxo.

Tratamento	Baixa produção de peróxido de hidrogênio
Botucurio	25,93 ± 27,27 a
Botucurio + antocianina	29,86 ± 31,22 a
Dimetil	36,52 ± 34,16 a
Dimetil + antocianina	46,50 ± 32,42 a
Etileno	27,77 ± 30,64 a
Etileno + antocianina	35,97 ± 34,83 a
Etileno + dimetil	46,03 ± 36,93 a
Etileno + dimetil + antocianina	39,45 ± 27,84 a

Valores médios seguidos por letras minúsculas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Quanto à produção de peróxido de hidrogênio intracelular, o tratamento D apresentou maior porcentagem de células com membrana íntegra e alta produção interna de peróxido de hidrogênio. Os tratamentos em que havia dimetilformamida como crioprotetor apresentaram valores médios de população de células íntegras e com baixa peroxidação maiores que aqueles tratamentos com diluentes sem este crioprotetor. A porcentagem de células lesionadas produzindo muito peróxido de hidrogênio foi menor no tratamento DA (36,1%). A porcentagem de células com membrana lesionada e baixa produção de peróxido de hidrogênio intracelular mostrou-se semelhante em todos os tratamentos ($P > 0,05$) (Tabela 7).

A organização da membrana plasmática foi considerada sobre a população de células íntegras (IP-) e não mostrou diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$). Paralelamente a maior porcentagem de espermatozoides viáveis (membrana íntegra) foi

encontrada nos tratamentos empregando diluentes com dimetilformamida como crioprotetor, com ou sem associação com antocianina(D=37,9% e DA=34,8%).

A exposição das células espermáticas a temperaturas abaixo de 19 °C por si só já é capaz de induzir processos de desorganização da bicamada lipídica da membrana plasmática (Watson, 1995). Somados aos efeitos ocasionados pela temperatura, os aditivos presentes nos diluentes de resfriamento e congelamento induzem a mudanças no processo metabólico dos espermatozoides, o que pode induzir respostas internas de aumento de produção de ATP e até mesmo à capacitação precoce destas células.(Loomis, 2005).

Tabela 7. Médias e erros-padrão (%) de atividade mitocondrial de sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador, utilizando diferentes crioprotetores e um antioxidante (sonda DCFDA; IP).

TRAT	Membrana íntegra e baixa produção de peróxido	Membrana íntegra e alta produção de peróxido	Membrana lesionada e alta produção de peróxido	Membrana lesionada e baixa produção de peróxido
B	8,4 ± 8,1 c	15,9 ± 7,6 b	58,2 ± 22,7 a	17,5 ± 21,8 a
BA	8,4 ± 5,9 c	15,9 ± 9,5 b	54,2 ± 24,9 ab	21,5 ± 25,7 a
D	13,0 ± 10,5 abc	21,8 ± 12,8 a	41,6 ± 23,3 bc	23,5 ± 25,2 a
DA	15,1 ± 12,2 a	17,4 ± 11,8 ab	36,1 ± 22,5 c	31,3 ± 22,9 a
E	8,1 ± 9,1 c	12,9 ± 6,6 b	59,3 ± 28,4 a	19,7 ± 24,4 a
EA	9,0 ± 7,2 bc	12,5 ± 9,6 b	51,5 ± 29,7 ab	26,9 ± 29,0 a
ED	13,7 ± 9,5 ab	13,5 ± 9,0 b	40,5 ± 28,7 bc	32,3 ± 27,7 a
EDA	11,5 ± 6,4 abc	16,6 ± 9,5 b	43,9 ± 21,8 bc	28,0 ± 23,4 a

Na mesma coluna, letras diferentes indicam diferença (P < 0,05) pelo teste t; TRAT: Tratamento; B: Botucurio; BA: Botucurio+Antocianina; D:Dimetilformamida; DA: Dimetilformamida+Antocianina; E: Etilenoglicol; EA: Etilenoglicol+Antocianina; ED: Etilenoglicol+Dimetilformamida; EDA: Etilenoglicol+Dimetilformamida+Antocianina.

O processo de capacitação ocorre por meio de desorganização dos lipídeos e colesterol de membrana, que permitem a entrada de cálcio, aumentam a produção de AMPc, diminuem o pH e desencadeiam uma série de outros eventos (Burnaugh, 2007). Na tentativa de estimar a quantidade de espermatozoides que eventualmente estariam passando por esse processo precocemente, foram utilizadas as sondas M450 e DCFDA, que avaliam respectivamente, a organização da membrana e a produção de peróxido de hidrogênio intracelular. Neste estudo, todos os tratamentos mostraram aproximadamente metade das células com membrana desorganizada (Tabela 8), levando

em consideração apenas as células com membrana plasmática íntegra. Dados estes valores, podemos presumir que se esta desorganização está ligada à capacitação, todos os tratamentos induziram esse processo de forma semelhante ou que as células coradas com a sonda estavam em processo inicial de capacitação ou tiveram mínima desorganização de membrana que pode não ser suficiente para inabilitar os espermatozoides de realizar a fecundação, uma vez que a sonda não diferencia graus de desorganização (Green& Watson, 2001).

Tabela 8. Médias e erros-padrão (%) de organização de membrana dos espermatozoides criopreservados de garanhões da raça Mangalarga Marchador utilizando diferentes crioprotetores e um antioxidante (sondas M540-organização de membrana e IP-integridade de membrana plasmática).

TRAT	Membrana organizada	Membrana desorganizada	Membrana íntegra	Membrana lesionada
B	53,7 ± 18,8 a	46,3 ± 18,8 a	27,5 ± 9,6 cd	72,5 ± 9,6 ab
BA	47,1 ± 18,9 a	52,9 ± 18,9 a	27,2 ± 7,7 cd	72,8 ± 7,7 ab
D	56,4 ± 14,7 a	43,6 ± 14,7 a	37,9 ± 9,2 a	62,1 ± 9,2 d
DA	59,8 ± 19,7 a	40,2 ± 19,7 a	34,8 ± 11,2 ab	65,2 ± 11,2 cd
E	56,8 ± 20,5 a	43,2 ± 20,5 a	23,6 ± 7,6 d	76,4 ± 7,6 a
EA	62,3 ± 16,6 a	37,7 ± 16,6 a	23,7 ± 10,1 d	76,3 ± 10,1 a
ED	63,5 ± 15,9 a	36,4 ± 15,9 a	29,4 ± 8,6 c	70,6 ± 8,6 b
EDA	55,7 ± 18,7 a	44,3 ± 18,7 a	30,9 ± 10,9 bc	69,0 ± 10,9 bc

Valores médios seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan. Os valores de organização de membrana consideraram apenas células com membrana íntegra. TRAT: Tratamento; B: Botucrio; BA: Botucrio +Antocianina; D: Dimetilformamida; DA: Dimetilformamida + Antocianina; E: Etilenoglicol; EA: Etilenoglicol + Antocianina; ED: Etilenoglicol + Dimetilformamida; EDA: Etilenoglicol + Dimetilformamida + Antocianina.

Na Tabela 9 são descritos os valores médios para integridade de membranas plasmática e acrossomal, sendo observado os maiores valores de membranas íntegras nos tratamentos em que se empregou diluentes com dimetilformamida ou a associação da mesma com a antocianina (D=28,2 % e DA=26,5 %). A porcentagem de espermatozoides com ambas as membranas lesionadas foi maior nos tratamentos B (31,9%), BA (32,1%), E (30,9%) e EA (32,8 %).

Para integridade das membranas plasmática e acrossomal, os tratamentos D, DA e EDA apresentaram resultados superiores quando comparados aos outros tratamentos (aproximadamente 10% a mais), o que ressalta a capacidade e eficiência da

dimetilformamida em atravessar a membrana sem causar grandes danos à mesma. Esses resultados corroboram os resultados obtidos por Freitas(2015) quando comparou dimetilformamida com glicerol puro e Botucrio, comprovando o potencial crioprotetor da dimetilformamida sobre a membrana plasmática. Por ser uma partícula de menor peso molecular, as amidas atravessam a membrana mais facilmente, evitando lesões por estresse osmótico (Ball e Vo, 2001).

Tabela 9. Médias e erros-padrão (%) da integridade das membranas plasmática (sonda FITC-PSA) e acrossomal (sonda IP) das células espermáticas criopreservadas de garanhões da raça Mangalarga Marchador, utilizando diferentes crioprotetores e um antioxidante e incubadas a 37°C por 10 minutos com as sondas e avaliadas em citômetro de fluxo.

Tratamento	Membrana e acrossoma íntegros	Membrana íntegra e acrossoma lesionado	Membrana e acrossoma lesionados	Membrana lesionada e acrossoma íntegro
B	19,2± 7,3 bcd	2,4 ± 2,8 abc	31,9 ± 7,9 a	46,5 ± 6,5 a
BA	19,2 ± 7,0 bcd	2,3 ± 3,2 abc	32,1 ± 8,3 a	46,4 ± 6,1 a
D	28,2 ± 6,9 a	2,5 ± 3,8 ab	22,0 ± 7,2 c	47,3 ± 4,9 a
DA	26,5 ± 8,9 a	2,7 ± 4,1 a	23,6 ± 9,8 bc	47,3 ± 6,1 a
E	18,5 ± 7,9 cd	0,6 ± 0,2 bc	30,9 ± 8,4 a	49,3 ± 7,8 a
EA	16,8 ± 8,5 d	0,5 ± 0,3 c	32,8 ± 9,3 a	50,0 ± 9,2 a
ED	22,3 ± 5,9 b	2,3 ± 4,4 abc	25,8 ± 8,8 bc	50,1 ± 7,4 a
EDA	21,1 ± 7,3 bc	3,9 ± 5,3 a	26,0 ± 9,1 b	49,0 ± 9,7 a

Valores médios seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste de Duncan. Os valores de organização de membrana consideraram apenas células com membrana íntegra. TRAT: Tratamento; B: Botucrio; BA: Botucrio +Antocianina; D: Dimetilformamida; DA: Dimetilformamida + Antocianina; E: Etilenoglicol; EA: Etilenoglicol + Antocianina; ED: Etilenoglicol + Dimetilformamida; EDA: Etilenoglicol + Dimetilformamida + Antocianina.

Ramos (2012) sugeriu que a adição de antocianina ao diluente de congelamento de sêmen caprino pudesse melhorar os parâmetros de motilidade e integridade das membranas plasmática e acrossomal, o que não foi possível identificar neste trabalho. No entanto, esta substância pode ter exercido papel antioxidante importante no meio externo. Embora não tenha apresentado diferença entre os tratamentos, pode-se observar que a antocianina teve tendência a diminuir a quantidade de peróxido de hidrogênio das células com membrana plasmática lesionada. Na tabela 7, onde se descreve os valores médios obtidos para membrana lesionada e baixa produção de peróxido, é possível observar que os tratamentos empregando diluentes com antocianina apresentaram maior

porcentagem de células com baixa produção de peróxido de hidrogênio mesmo estando mortas, comparados aos sem antocianina com o mesmo crioprotetor (B=17,5 x BA=21,5 %; D=23,5 x DA=31,3 %; E=19,7 x 26,9 %; ED=32,3 x EDA=28,0 %), no entanto não é possível dizer que houve diferença entre os tratamentos com e sem antocianina.

Sendo uma molécula relativamente grande, a antocianina tem dificuldade de atravessar a membrana plasmática (Volp, 2008), porém quando esta barreira encontra-se afunilada, a troca de material com o meio externo fica comprometida, podendo haver passagem dessa molécula para o interior da célula. Exatamente nesta população celular (membrana lesionada) podemos identificar maior distância numérica entre o crioprotetor puro e acrescido do antioxidante, embora não seja possível afirmar que há diferença entre esses resultados. Damesma forma, os valores médios obtidos para membrana lesionada e alta produção de peróxido de hidrogênio também se mostram favoráveis aos tratamentos com antocianina (B=58,2 x BA=54,2; D=41,6 x DA=36,1; E=59,3 x EA=51,5; ED=40,5 x EDA=43,9 %), mostrando que este flavonoide pode ter efeito na redução de peróxido de hidrogênio liberado por essa população celular.

CONCLUSÕES

A dimetilformamida pode ser usada sozinha na concentração de 5% ou em associação com etilenoglicol na proporção de 1:4 (etilenoglicol:dimetilformamida), sendo eficaz principalmente na diminuição dos efeitos deletérios às membranas plasmática e acrossomais dos espermatozoides criopreservados do sêmen equino, tornando-a alternativa em substituição aos diluentes comerciais à base de glicerol e metilformamida como crioprotetores.

A antocianina, da forma como foi extraída neste experimento e na concentração de 0,5µL/100 x 10⁶ células espermáticas não possui ação antioxidante intracelular, benéfica ou maléfica para a membrana plasmática dos espermatozoides durante o processo de criopreservação do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; HEDGES, A.; MCLACHLAN, R. I. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2415–2426. 2010.

ALVARENGA, M.A. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: **Workshop on Transporting Gametes and Embryos, 2003, Brewster, Mass.** Proceedings...New York, NY: Havemeyer Foundation, p. 74-76, 2003.

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

AMANN, R.P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics **Journal of Andrology** p. 237. 1981.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L.: **Equine Reproduction**, Filadelfia: Lea & Febiger, p. 715-745. 1992.

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

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

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). **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, SP. Tese. 2000.**

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

AVANZI, B.R. Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas. **Veterinária e Zootecnia**, 18(2): 226-238, 2011.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069. 2001.

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. 2003

BESSA, A.M.; ROCHA, A.; AGUIRRE, A.M. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. **Theriogenology**, v.66, p. 2047-2055. 2006

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L. Semen preservation. **Manual of equine reproduction**, 2ed. Philadelphia, p165-177, 2003.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, E. F.; MADEIRA, E. M.; ULGUIM, R. R.; CORCINI, C. D. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 69, p. 632-638. 2008.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO, A.L.; SANTOS, A.D.F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R.B.S.; CHALHOUB, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, p.27-32. 2004.

BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v. 67, p.701-706. 2007.

BURNAUGH, L.; BALL, B. A.; SABEUR, K.; THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 249-260. 2010.

BUSTAMANTE FILHO, I. C.; PEDERZOLLI, A. M.; SGARAVATTI, A. M.; MATTOS, R. C.; DUTRA FILHO, C. S.; JOBIM, M. I. M. Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 70-73. 2006.

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

CHENIER, T. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. In: **Proceedings for Annual Meeting, Society for Theriogenology, 1998, Baltimore, MD**. Proceedings... St Louis, MS: Society for Theriogenology, p.52-53, 1998.

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

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

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

DONA, G.; FIORE, C.; ANDRISANI, A.; AMBROSINI, G.; BRUNATI, A.; RAGAZZI, E.; ARMANINI, D.; BORDIN, L.; CLARI, G. Evaluation of correct endogenous reactive oxygen species content for human sperm capacitation and involvement of the NADPH oxidase system. **Human Reproduction**, v. 26, p.3264-3273. 2011.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251-260. 1996

FREITAS, B.W.; GUIMARÃES, J.D. **Efeito de diferentes crioprotetores e aditivos no diluente sobre a qualidade seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador**. Tese. Universidade Federal de Viçosa. 2015.

FÜRST R.; CARVALHO G.R.; FÜRST M.C.O. Efeito do resfriamento do sêmen sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.599-607. 2005.

GIBB, Z.; MORRIS, L. H. A.; MAXWELL, W. M. C.; GRUPEN, C. G. Dimethylformamide improves the postthaw characteristics of sex-sorted and non-sorted stallion sperm. **Theriogenology**, v. 79, p. 1027-1033. 2013.

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

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

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

GRAHAM J.K. Sperm physiology: response to freezing and analysis of sperm function. **Annual meeting of society for Theriogenology**. p.54-9, 1998.

GREEN, C. E.; WATSON, P. F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v. 122, p. 889- 898. 2001.

GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 2, p.169-180, 2012.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700-1708. 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press: New York** p. 936, 3ed. 1999.

HOFFMANN, N.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified “good” or “poor” for freezing. **Animal Reproduction Science**, v.125, p. 112-118, 2011.

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. **Journal of Experimental Zoology**, v. 230, n. 3, p. 473-483, 1984.

JASKO, D.J., HATHAWAY, J.A., SCHALTENBRAND, V.L., SIMPER, W.D., SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology** 37, 1241–1252, 1992.

JOBIM, M.I.M.; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; GREGORY, R.M.; SIEME, H.; MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 76, p. 765-771, 2011.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p.1217-1227, 1997.

KAYSER JP, AMANN RP, SHIDELER RK. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601-614, 1992.

KEITH SL. 1998. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. Fort Collins, Colorado, USA: Colorado State University. Thesis (Master of Science), CSU. 1998

KIM, S.; LEE, Y.; YANG, H.; KIM, Y. Rapid freezing without cooling equilibration in canine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.130, p. 111-118. 2012.

KUNDU, C. N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOST, A.; MAJUNDER, G. Development of a simple cryopreservation

model using a chemical defined medium and the goat caudal epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, p. 117-125. 2000.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; FETT, R. Antioxidant capacity of frozen fruits pulps. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr.** 31(1):53-64, 2006.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 113-141, 2000.

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

LOVE, C.C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**;76:547-557, 2011.

LOVELOCK, J.E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochemic Journal**, v.58, p.618-622. 1954.

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

MACÍAS-GARCÍA, B.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; GALLARDO-BOLANOS, J. M.; PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; MORRELL, J. M. Androcoll-E largeselects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. **Animal Reproduction Science**, v. 132, p. 74-82. 2012a.

MACÍAS-GARCÍA, B.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; APARICIO, I. M.; MIRÓMORÁN, A.; MORILO RODRIGUEZ, A.; GALLARDO BOLAÑOS, J. M.; GONZÁLES FERNÁNDEZ, L.; BALÃO DA SILVA, C. M.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. **Theriogenology**, v. 77, p. 1280-1289. 2012b.

MADEIRA, E. M.; BIANCHI, I.; VIEIRA, M. B.; SCHNEIDER, A.; SEVERO, N. C.; PFEIFER, L. F. M.; CORRÊA, M. N. Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 415-420. 2013.

MEDEIROS, A.S. Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões. **Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. Dissertação** 2003.

MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P.; NEVES NETO, J.R.; VISINTIN, J.A.; FAGUNDES, A.C. Congelamento de sêmen equino em etilenoglicol ou glicerol: motilidade, vigor e teste de termorresistência; estudos preliminares. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução animal, 11, 1995, Belo Horizonte**. Anais... Belo Horizonte: CBRA, p.290, 1995.

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.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERUMAN, H.T. **Cryobiology**. New York: Academic Press., 179-220 p. 1966

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, p. 721-727. 1999.

NEVES NETO, J.R.; MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P. Fertilidade do sêmen congelado equino em etilenoglicol e glicerol. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11, 1995, Belo Horizonte. Anais...Belo Horizonte: CBRA, p 292, 1995.

OLIVEIRA, G.C.; OLIVEIRA, B.M.M.; ARRUDA, R.P.; ZAFFALON, F.G.; NASCIMENTO, J.; FERNANDES, C.B.; COLEGHINI, E.C.C. Características espermáticas do sêmen equino congelado com diferentes crioprotetores. In: Conferência Anual da Abreveq, 9, 2010, São Paulo. Anais...São Paulo, SP: ABRAVEQ, vol.29, p304-305, 2010.

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.

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

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.D.G. Plant secondary metabolites and antioxidant benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 3, N° 4. 2012

PHELPS, M. J.; LIU, J.; BENSON, J. D.; WILLOUGHBY, C. E.; GILMORE, J.A.; CRITSER, J. K. Effect of Percoll separation, cryoprotective agents and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance for cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 10312-1041. 1999.

PINHO, R. O.; LIMA, D. M. A.; CAMILO, B. S.; SHIOMI, H. H.; MOREIRA, A. C. G.; VERGARA, J. C. M.; LOPES, P. S.; GUIMARÃES, J. D. Utilização de antocianina na criopreservação de sêmen de suínos da raça Piau. In: XXIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2014, Vitória. Anais...Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666. 1949.

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

RAMOS, P. C. A. Uso de antocianina na criopreservação de sêmen caprino. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

ROOKE, J.A.; SHAO, C-C; SPEAKE, B.K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. **Reproduction**, v. 121, p. 315-322. 2001.

ROWE, A.M. Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing. **Cryobiology**, v.3, p.12-18. 1966.

SANTOS, M.A.M., Gradela A, Moraes, E.A., Souza, W.L., Alves, N.G., Costa J.M.S., Matos, W.C.G. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35(11): 925-932, 2015.

SENGER PL. Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen. **In: MORROW, D. A. (Eds.). Current therapy in theriogenology. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 116-174. 1986**

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

SILVA, P.I. Otimização da extração e microencapsulamento de fenólicos e antocianinas de jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*). 159 f. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Tese, 2011.

SIKKA, S. C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 5-18. 2004.

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

STICH, K.; BRINSKO, S.; THOMPSON, J.; LOVE, C.; MILLER, C.; BLANCHARD, T.; VARNER, D. Stabilization of extragonadal sperm reserves in stallions: application for determination of daily sperm output. **Theriogenology**, v. 58, p. 397-400. 2002.

STRADIOLI, G.; RUBEI, M.; ZAMPARINI, M.; TUBARO, F.; VALENTINI, S.; DEGLINNOCENTI, S.; MONACI, M. Enzymatic evaluation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 29. 2006.

TERRACIANO, P.B.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; MIQUELITO, L.V.; ARLAS, T.R.; CASTRO, F.; MATTOS, R.C.; PASSOS, E.P.; OBERST, E.R.; LIMA, E.O.C. Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento

combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. **Ciência Rural**, v. 38, p. 1972-1977. 2008.

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; MACPHERSON, M.L., POZOR, M.P. Persistent breeding-induced endometritis. **Pferdeheilkunde**, v.24.p.56-60.2008

VARELA JR, A.S.V.; CORCINI, C.D.; GHELLER, S.M.M.; LUCIA JR, T.; STREIT JR.; M.R.C. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossomacropomum*. **Theriogenology**, v.78, p. 244-251, 2012.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P. Ancillary semen tests for stallions: which one to use and what do they mean. **Proc Soc For Theriogenology, Louisville, USA, August**, p- 343-58. 2013

VOLP, A.C.P.; RENHE, I.R.T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P.C. Flavanóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Rev Bras NutrClin**, 23[2]:141. 2008

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