

**BRUNA WADDINGTON DE FREITAS**

**EFEITO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES E ADITIVOS NO DILUENTE  
SOBRE A QUALIDADE SEMINAL DE GARANHÕES DA RAÇA  
MANGALARGA MARCHADOR**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2015

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

T

F866e  
2015  
Freitas, Bruna Waddington de, 1982-  
Efeito de diferentes crioprotetores e aditivos no  
diluyente sobre a qualidade seminal de garanhões da raça  
Mangalarga Marchador / Bruna Waddington de Freitas. -  
Viçosa, MG, 2015.  
xii, 102f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : José Domingos Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Mangalarga (Cavalo). 2. Reprodução *in vitro*.  
3. Sêmen. 4. Antioxidante. 5. Criopreservação.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina  
Veterinária. II. Título.

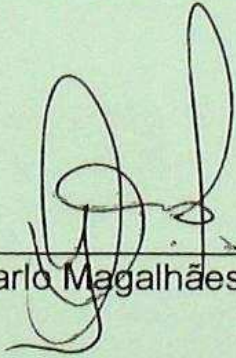
CDD 22. ed. 636.10824

BRUNA WADDINGTON DE FREITAS

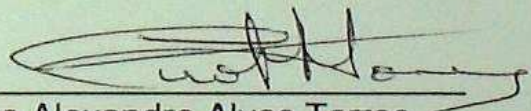
**EFEITO DE DIFERENTES CRIOPROTETORES E ADITIVOS NO DILUENTE  
SOBRE A QUALIDADE SEMINAL DE GARANHÕES DA RAÇA  
MANGALARGA MARCHADOR**

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

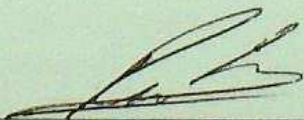
APROVADA: 27 de fevereiro de 2015.



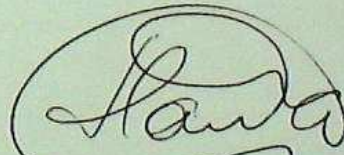
Giancarlo Magalhães dos Santos



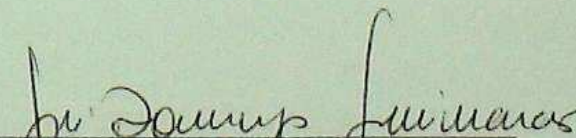
Ciro Alexandre Alves Torres



Rogério Oliveira Pinho



Tarcízio Antônio Rego de Paula



José Domingos Guimarães  
(Orientador)

**Este trabalho é primariamente resultado do amor e dedicação daqueles que representam a base da minha existência. À minha família dedico e devo absolutamente todas as minhas conquistas.**

## AGRADECIMENTOS

Foram pouco mais de quatro anos de reviravoltas e experiências muito bem vividas para contar... E, posso dizer que, ao longo desses anos, o que não falta é gente pra agradecer e reverenciar. Tão importante quanto o conhecimento adquirido com essa tese é o reconhecimento daqueles que fizeram diferença para que essa meta fosse cumprida.

Em primeiro lugar, não poderia ser diferente, agradeço e louvo à minha família. Eles que sempre estiveram ao meu lado me dando todo o suporte necessário para mais essa realização. Antonio Carlos, Regina e Pedro são quem merecem os verdadeiros louros dessa conquista. Obrigada por tudo, sempre e pra sempre.

À minha filhota Anna Beatriz, que foi o maior presente recebido por Deus, por existir. Ela que deu cor à minha vida e faz hoje tudo valer a pena. Minha razão de viver, obrigada por me imprimir o melhor sorriso e por conseguir transformar todos os problemas do dia a dia em meros detalhes quando estamos juntas. Amo tanto que não cabe no peito!

Ao meu orientador JD, pelas ideias, discussões, orientação e apoio ao longo desses anos. E, principalmente, obrigada por não ter desistido de mim durante a minha gestação e quando estive doente. Por respeitar minha situação e dar incentivo para que tudo fosse adiante, apesar dos pesares, meu agradecimento eterno.

Ao prof Giovanni, pela ajuda no delineamento experimental e disponibilidade de uso dos animais e estrutura da Equideocultura. Obrigada mesmo por todo apoio e orientação desde os meus primeiros anos de graduação.

Outro agradecimento especial é ao prof. Leandro Licursi. Graças a ele consegui finalizar meu experimento. Obrigada por me ensinar a citometria de fluxo e permitir que ela se tornasse uma realidade para todos nós da Reprodução Animal da UFV. E obrigada por tanta disponibilidade, paciência e ideias para enriquecimento do meu estudo.

Aos professores membros das bancas de qualificação e defesa de tese Ciro Torres, Eduardo Paulino, Tarcízio e Giancarlo, pela disponibilidade, sugestões e correções desse trabalho.

Um agradecimento especial ao colega e membro das bancas Rogério Pinho, por ter me ajudado e acrescentado tanto ao meu trabalho. Sem contar o incentivo desde a época do mestrado, às ideias trocadas nesse tempo e às soluções dadas aos problemas que todo pós graduando passa.

Ao Fernando, responsável pela Equideocultura, meu agradecimento é especial, pelo apoio de sempre, palavras, torcida, intermediações, companheirismo e amizade. Sem dúvidas, a pessoa que fez toda diferença na minha pós graduação. Obrigada por tudo! E aos demais funcionários do setor, Zé, Arcino, Bernardo, Dimas, Sílvio, Roberto e Sebastião.

Aos proprietários dos Haras onde foram feitas parte das coletas de material, Roberto Cordeiro e José Américo, por disponibilizarem os animais e a estrutura física para que tudo fosse processado. Além dos funcionários Gustavo e Wilson, que tanto ajudaram e se envolveram no experimento, disponibilizando de tempo e boa vontade para que tudo desse certo.

Aos estagiários da Equideocultura Adriana, Carlos, Carol, Charles (*in memoriam*), Cíntia, Claudiana, Cristian, Daniel, Duda, Flávia, Iana, Igor, Lorena, Mariana, Nicolás, Pablo, Thayne e Vanessa, por terem se disponibilizado e auxiliarem nas coletas e preparo dos materiais.

Aos meus estagiários Thiago e Amanda que trabalharam dia e noite, finais de semana e feriados... Além da ótima convivência, harmonia e carinho recebido, agradeço por terem tomado pra si a responsabilidade de tocar o experimento e assim fizeram com absoluta competência.

E por falar em competência, não posso deixar de agradecer de forma especial a Maria, na época mestrande do Departamento de Zootecnia e responsável por um engrandecimento há muito tempo não visto no Setor de Equideocultura da UFV. Além de batalhadora e competente, é pé no chão, carismática e domina como poucos a arte do cavalo. A ela não me faltam admiração e gratidão. Uma das amigas que esse doutorado me rendeu...

Outras amigas geradas nesse tempo foram as da Gisele, Luciana e Priscilla. Amigas da pós graduação que além de me renderem de boas gargalhadas, tornaram a árdua tarefa experimental mais leves e eficientes. Obrigada por tanto carinho e companheirismo... Levo essas três debaixo do braço e dentro do coração para onde a vida me levar!

Não posso deixar de referenciar de maneira especial a Camila, que fez e continua fazendo tanto por mim. Não só participou de absolutamente todo o experimento como tomou a responsabilidade pra si quando eu não pude estar presente. Sem ela, sem dúvidas as coisas teriam sido bem mais complicadas e demoradas. Obrigada é pouco para agradecer por tanto.

Outro da lista dos especiais é meu querido irmão de alma Márcio. Amigo de quase 15 anos, hoje meu colega e mentor profissional, só tenho a agradecer todos os dias por ter a graça de conviver e compartilhar tantas vitórias e experiências.

Aos amigos da pós graduação e orientados do JD, Breno, Daniel, Denise, Faider, Hugo, Jhonatan, José Carlos, Paula, Taynan e Victor, por toda disponibilidade e sugestões.

Aos amigos irmãos que a Veterinária me deu há tantos anos Alberto, Julinho, Jura e Mococa, pelo companheirismo, atenção, carinho e cervejinhas de final de semana. E ao Jura pela análise estatística naquele momento de desespero total!

Aos funcionários e professores do Departamento de Veterinária e Zootecnia que me ajudaram das mais variadas formas, em todos os momentos: seu Didi, Renato, Dagô e Luiz Carlos e professores Nero, Cidinha e Simone por disponibilizarem reagentes e equipamentos utilizados ao longo do experimento.

Um agradecimento especial à Rosi, secretária da Pós Graduação do Departamento de Veterinária, por me socorrer em todos os momentos que precisei e até mesmo naqueles em que eu não sabia que precisaria de ajuda. Ainda faço um busto em homenagem a esse exemplo de profissional que salva todos os pós graduandos que passam pelo DVT!

Aos membros da equipe do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV Karla, Gilmar e Lourenço por disponibilizarem os equipamentos e toda estrutura física adequada para que parte das análises fossem realizadas.

À Botupharma, pela atenção e prontidão ao ceder todos os diluentes utilizados no experimento.

Às agências de fomento FINEP, FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo financiamento de equipamentos e materiais utilizados nos mais diversos setores da UFV. Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

E, por fim, mas não menos importante, meu agradecimento eterno à Universidade Federal de Viçosa, instituição que hoje considero minha casa e da qual tanto me orgulho.

MUITO OBRIGADA!

*“O motivo mais importante para trabalhar na escola e na vida é o prazer no trabalho, o prazer nos seus resultados e o reconhecimento do valor do resultado para a comunidade... Assim, o dito não está muito errado quando se define educação da seguinte forma. Educação é o que fica quando esquecemos tudo o que aprendemos na escola!”*

Albert Einstein, in “Discurso” (1936)

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1. Congelamento de sêmen.....	2
2. Crioprotetores.....	5
3. Incorporação de colesterol na membrana plasmática.....	11
4. Estresse oxidativo.....	14
5. Antioxidantes Flavonoides.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
CAPÍTULO 1: Associação de crioprotetores intracelulares na criopreservação de sêmen de garanhões.....	32
1. Introdução.....	32
2. Material e Métodos.....	34
2.1. Delineamento Experimental.....	34
2.2. Colheita de Sêmen.....	35
2.3. Congelamento de Sêmen.....	36
2.4. Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade espermática.....	36
2.4.1. Teste de termo-resistência (TTR).....	37
2.4.2. Citometria de fluxo.....	37
2.4.2.1. Avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal (IP/PSA).....	38
2.4.2.2. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1).....	39
2.4.2.3. Avaliação da peroxidação da membrana espermática (C11- BODIPY <sup>581/591</sup> /IP).....	40
2.4.2.4. Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular (DCFDA/IP).....	42
2.4.2.5. Avaliação da organização da bicamada lipídica (M540/6CFDA).....	43
2.5. Análise Estatística.....	44
3. Resultados e Discussão.....	45
4. Conclusão.....	54
5. Referências Bibliográficas.....	55
CAPÍTULO 2: Associação de diferentes aditivos e crioprotetores na criopreservação de sêmen de garanhões .....	64
1. Introdução.....	64
2. Material e Métodos.....	67
2.1. Delineamento Experimental.....	67

2.2. Preparação do complexo ciclodextrina-colesterol (CCC).....	69
2.3. Extração da antocianina.....	70
2.4. Colheita de sêmen.....	70
2.5. Congelamento de sêmen.....	71
2.6. Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade espermática.....	71
2.6.1. Teste de termo-resistência (TTR).....	71
2.6.2. Citometria de fluxo.....	72
2.6.2.1. Avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal (IP/PSA).....	72
2.6.2.2. Avaliação do potencial mitocondrial (JC-1).....	74
2.6.2.3. Avaliação da peroxidação da membrana espermática (C11-BODIPY <sup>581/591</sup> /IP).....	75
2.6.2.4. Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular (DCFDA/IP).....	76
2.5. Análise Estatística.....	78
3. Resultados.....	78
3.1. Teste de termo-resistência.....	78
3.2. Avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal .....	80
3.3. Avaliação do potencial mitocondrial.....	82
3.4. Avaliação da peroxidação da membrana espermática.....	83
3.5. Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular .....	85
4. Discussão.....	87
5. Conclusão.....	93
6. Referências Bibliográficas.....	94
 ANEXOS.....	 101

## RESUMO

FREITAS, Bruna Waddington de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2015. **Efeito de diferentes crioprotetores e aditivos no diluente sobre a qualidade seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador.** Orientador: José Domingos Guimarães.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de comparar os efeitos de diferentes crioprotetores e aditivos na criopreservação do sêmen equino sobre a viabilidade espermática *in vitro* pós-descongelamento. Para tanto, foram designados dois experimentos (*E*). No *E1* objetivou-se comparar o efeito do glicerol (GLIC) e da dimetilformamida (DMFA), associados ou não, sobre a viabilidade espermática *in vitro* pós-descongelamento, o que conferiu quatro grupos experimentais: glicerol a 5 % (GLIC), dimetilformamida a 5 % (DMFA), dimetilformamida a 3% associada ao glicerol a 2 % (DG) e o tratamento controle, composto pelo diluente comercial Botu-Crio<sup>®</sup> (BC). Já no *E2* objetivou-se avaliar o efeito do congelamento de sêmen de garanhões em diluente contendo glicerol e/ou dimetilformamida, associados à antocianina (ATC) e/ou colesterol carreado por ciclodextrina (CCC). Para tanto, os ejaculados foram congelados em dez diferentes tratamentos, de acordo com as associações entre crioprotetores e aditivos. As amostras de ambos os experimentos foram avaliadas mediante teste de termo-resistência (TTR) e por meio de citometria de fluxo quanto à integridade de membrana plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, produção de peróxido de hidrogênio intracelular e peroxidação lipídica da membrana plasmática; a avaliação quanto à organização da bicamada lipídica só foi realizada no *E1*. Os melhores resultados obtidos no TTR do *E1* foram referentes aos tratamentos DMFA e DG ( $p < 0,05$ ), que mantiveram as maiores médias de motilidade espermática total após trinta minutos de incubação a 37 °C. O potencial mitocondrial não sofreu alteração frente aos tratamentos aplicados ( $p > 0,05$ ). A maior proporção de células com integridade de membrana plasmática e acrossomal foi observada nos tratamentos DMFA e BC ( $p < 0,05$ ). A análise de organização de membrana revelou maior desorganização no tratamento GLIC ( $p < 0,05$ ). Foi observada maior proporção de células viáveis com alta produção de peróxido de hidrogênio no tratamento DMFA e menor proporção no tratamento GLIC

( $p < 0,05$ ). Quanto à peroxidação da bicamada lipídica, não foram observadas diferenças entre os valores médios nos tratamentos ( $p > 0,05$ ). Em relação ao E2, não houveram interações entre crioprotetores e diluentes para maioria das características estudadas, sendo as comparações realizadas entre grupos de tratamentos. Entre os crioprotetores, o grupo DMFA apresentou os melhores resultados quanto à motilidade espermática durante o TTR, seguido do grupo DG ( $p < 0,05$ ) e dentre os aditivos os grupos CCC e AC foram superiores aos demais ( $p < 0,05$ ). Em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal, os grupos BC e GLIC apresentaram os piores resultados dentre os crioprotetores, assim como os grupos BC e ATC dentre os aditivos ( $p < 0,05$ ). As maiores médias obtidas quanto ao potencial mitocondrial foram referentes aos grupos DMFA e DG entre os crioprotetores, e CCC e AC entre os aditivos ( $p < 0,05$ ). Foi observada maior proporção de células viáveis com alta produção de peróxido de hidrogênio nos grupos DMFA e DG dentre os crioprotetores, e nos grupos CCC e AC dentre os aditivos ( $p < 0,05$ ). Em relação à peroxidação da membrana plasmática foi observada interação entre crioprotetores e aditivos na população de células viáveis ( $p < 0,05$ ), de forma a revelar melhor associação da CCC à DMFA. Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que os tratamentos DMFA e DG apresentaram melhores condições para manutenção da viabilidade espermática *in vitro*, de forma que ambos podem ser utilizados como alternativa em diluidores na criopreservação de sêmen equino. Em relação ao uso da CCC, a sua associação deve ser feita preferencialmente com a DMFA. Os resultados obtidos quanto à ação da ATC não foram satisfatórios, necessitando de novos estudos quanto à concentração ideal e seus efeitos no congelamento de sêmen de garanhões.

## ABSTRACT

FREITAS, Bruna Waddington de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Effect of different cryoprotectants and additives in the diluent on seminal quality of Mangalarga Marchador stallions.** Adviser: José Domingos Guimarães.

The aim of this study was to compare the effects of different cryoprotectants and additives in cryopreservation of Mangalarga Marchador stallions semen on sperm viability *in vitro* post-thaw. Thus, we designed two experiments (*E*). In *E1* we aimed to compare the effect of glycerol and dimethylformamide, associated or not, on the sperm viability post-thawing. Therefore we collected thirty ejaculates from four stallions. Each one was divided into four treatments: 5% glycerol (GLYC), 5% dimethylformamide (DMFA), an association of 2% glycerol and 3% dimethylformamide (DG) and control treatment compound by Botu-Crio®. In *E2* we aimed to evaluate the effect of stallions semen freezing in diluent containing glycerol and or dimethylformamide associated with the anthocyanin (ATC) and or cholesterol loaded cyclodextrin (CCC). We collected forty-eight ejaculates of eight stallions and each one was frozen in ten different treatments, according to the associations between cryoprotectants and additives. The samples of both experiments were evaluated by thermo-resistance test (TTR) and by flow cytometry as to integrity of plasma and acrosomal membrane, mitochondrial potential, intracellular peroxide hydrogen production, lipid peroxidation and organization of the plasma membrane bilayer (only *E1*). The *E1* best results on the TTR were related to DMFA and DG treatments ( $p < 0.05$ ), who maintained the highest average total sperm motility after thirty minutes of incubation at 37 ° C. Mitochondrial potential was not affected by any group ( $p > 0.05$ ). The highest proportion of cells with plasma and acrosomal membrane integrity was observed in DMFA and BC treatments ( $p < 0.05$ ). The analysis revealed the organization of membrane disruption was greater in GLIC treatment ( $p < 0.05$ ). We observed a higher proportion of cells with high production of hydrogen peroxide in the treatment DMFA and a lower proportion in GLIC treatment ( $p < 0.05$ ). As for the peroxidation of the lipid bilayer, no differences were observed between treatments ( $p > 0.05$ ). About *E2* there were no interactions between cryoprotectants and diluents for most traits,

with comparisons made between treatment groups. Among the cryoprotectants, DMFA group showed the best results on the TTR, followed by DG group ( $p < 0.05$ ) and among the additives CCC and AC groups were superior to the others ( $p < 0.05$ ). Regarding the integrity of plasma and acrosomal membrane, the BC and GLYC groups showed the worst results among cryoprotectants, as well as BC and ATC groups among the additives ( $p < 0.05$ ). The highest mean about mitochondrial potential were related to DMFA and DG groups among cryoprotectants, and CCC and AC between additives ( $p < 0.05$ ). There was a higher proportion of cells with high production of hydrogen peroxide in DMFA and DG groups from the cryoprotectants, and CCC and AC groups among the additives ( $p < 0.05$ ). In relation to the plasma membrane peroxidation was observed interaction between cryoprotectants and additives in the population of viable cells ( $p < 0.05$ ), in order to better reveal the association CCC plus DMFA. It was concluded that the DMFA and DG treatments showed better conditions for maintaining sperm viability *in vitro*, so both can use like alternative method for cryopreservation of stallion semen. The association with the CCC should be made preferably by with DMFA. The results related to ATC were not satisfactory, revealing with it the need for new studies about its optimal concentration and effects on semen freezing stallions.

## INTRODUÇÃO

As biotecnologias aplicadas à reprodução animal são consideradas ferramentas importantes para o progresso no melhoramento genético por possibilitarem a obtenção do maior número de produtos produzidos num espaço de tempo reduzido, com conseqüente otimização da vida reprodutiva de animais zootecnicamente superiores. Nesse sentido, mesmo com os avanços conquistados nos últimos anos na área da Reprodução Animal, a inseminação artificial (IA), quando aplicada de forma eficiente e racional, continua proporcionando maior difusão e impacto na produção animal por utilizar-se de procedimentos simples e de baixo custo em relação a outras tecnologias utilizadas a campo.

Embora a IA com sêmen congelado seja uma técnica bem estabelecida em bovinos (BARBOSA & MACHADO, 2008), o seu uso em equinos esteve restrito por muitos anos devido a regulamentações proibitivas das associações de criadores (SAMPER, 2007), desacelerando o melhoramento genético dos plantéis e desestimulando as pesquisas voltadas para a espécie. Porém, esse cenário vem se alterando e as legislações das associações têm se tornadas flexíveis ao permitirem o registro de animais oriundos da IA, gerando com isso, grande impacto na indústria equestre mundial (PAPA et al., 2005; AURICH & AURICH, 2006; LOOMIS, 2006).

Atualmente, a menor taxa de fertilidade do sêmen congelado comparada à do sêmen fresco ou resfriado aliada à necessidade de controle folicular em intervalos curtos de tempo constituem duas das maiores limitações na aplicabilidade plena e satisfatória da IA com sêmen congelado na rotina de criatórios comerciais. Essa é uma realidade que, aliada à demanda comercial pelo uso da técnica de IA com sêmen congelado, tem incentivado diversos pesquisadores na área de criopreservação de sêmen equino a desenvolverem técnicas e protocolos alternativos ao procedimento padrão de congelamento de sêmen de garanhões. Diante disso, objetivou-se com o presente trabalho, avaliar diferentes crioprotetores e aditivos, associados ou não, na viabilidade *in vitro* do sêmen descongelado de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 1. CONGELAMENTO DE SÊMEN

O congelamento de sêmen foi desenvolvido de forma empírica há cerca de 65 anos e continua baseado essencialmente no mesmo modelo proposto desde o seu advento. Historicamente, os danos causados pela criopreservação são explicados de acordo com duas hipóteses (MAZUR, 1970): células resfriadas abruptamente são mortas em função da formação de gelo intracelular, enquanto que as células resfriadas lentamente são mortas em função da exposição prolongada a soluções concentradas, o que resulta em desidratação celular (MAZUR, 1984). Em função disso, a criopreservação é um procedimento reconhecidamente deletério para as células espermáticas por reduzir sua sobrevivência e, por consequência, seu potencial fertilizante (YESTE et al., 2014a). Essa redução na fertilidade ocorre em função do impacto do processo de congelamento/descongelamento sobre a integridade da membrana plasmática e de outros parâmetros funcionais (WATSON, 2000). Além disso, ocorrem variações entre indivíduos e ejaculados em relação à tolerância espermática ao congelamento, tanto na espécie equina (TISCHNER, 1979) como em outras espécies (CASAS et al., 2009; YESTE et al., 2013; 2014b).

Danos moleculares resultantes do congelamento de sêmen têm sido estudados extensivamente (PEÑA et al., 2011). Embora animais tidos como “mau congeladores” apresentem motilidade e integridade de membrana prejudicadas, existem outros fatores relevantes que afetam a viabilidade espermática no processo de congelamento, como a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), a redução da atividade mitocondrial (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008) e a baixa estabilidade de cromatina (BAUMBER et al., 2003). Além disso, outros parâmetros espermáticos como permeabilidade de membrana, desorganização da bicamada lipídica e concentrações intracelulares de cálcio apresentam diferenças pré e pós congelamento (WATSON, 2000; COOTER et al., 2005; CHAVERIO et al., 2006; WONGTAWAN et al., 2006; YESTE et al., 2014a).

O sucesso da criopreservação depende da interação de fatores como o crioprotetor utilizado, tipo de diluidor, curva de resfriamento e descongelamento e tipo de envase (COOTER et al., 2005; ANDRABI, 2007; CLULOW et al., 2008). Para que o congelamento seja considerado satisfatório, o espermatozoide deve manter sua capacidade fertilizante após o descongelamento e, para tanto, deve ser capaz de manter a habilidade de produzir energia via metabolismo, manter a configuração normal e integridade da membrana plasmática, manter sua motilidade, bem como a integridade acrossomal. A perda de qualquer uma dessas funções ou habilidades irá afetar significativamente a capacidade de fertilização do espermatozoide e o maior risco para a manutenção desses atributos é a formação de cristais de gelo e o movimento de água resultante do gradiente osmótico gerado durante o processo de criopreservação (LEMMA, 2011).

Antes de se dar início ao processo de congelamento, faz-se necessário o resfriamento do sêmen. À medida que a temperatura diminui (até 5° C), a membrana espermática passa por uma fase transitória do estado líquido para o gel (AMANN & PICKETT, 1987). Nesse momento, as proteínas da membrana podem se agregar, levando ao aumento na permeabilidade da membrana espermática e redução do metabolismo celular. Os danos causados nessa fase são irreversíveis e culminam com o denominado choque térmico (AMANN & GRAHAM, 1993). As principais alterações provenientes dessa condição são o aumento do movimento circular, rápida queda da motilidade e danos na membrana plasmática e acrossomal (GRAHAM, 1996).

Durante o processo de congelamento, existem duas faixas de temperatura que são consideradas críticas ao espermatozoide: o período de super-resfriamento (0 a -5° C) e a de formação de cristais de gelo (-6 a -15° C) (WOELDERS, 1997). À medida que a temperatura é reduzida abaixo de 0° C, a amostra torna-se super-refrigerada, e os cristais de gelo extracelulares começam a se formar a partir da água contida no meio circundante. Essa formação de gelo aumenta a concentração de solutos e, em resposta ao novo gradiente osmótico, aliado ao fato de a água intracelular congelar-se mais lentamente que a água do meio extracelular, a mesma sai do espermatozoide através da membrana plasmática e, conseqüentemente, o espermatozoide torna-se cada vez mais desidratado (WATSON, 2000; ANDRABI, 2007). A taxa

de efluxo da água também depende da velocidade da curva de resfriamento: quanto mais lenta, maior o tempo para o efluxo e conseqüentemente maior desidratação, porém com redução na formação de gelo intracelular que poderia causar dano físico ao espermatozoide (AMANN & PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990). Por outro lado, se a curva de resfriamento é rápida, a água tem pouco tempo para sair da célula e, com isso, grandes cristais de gelo são formados, causando danos físicos à membrana e outros componentes celulares (DUNCAN & WATSON, 1992). No entanto, o problema de desidratação e concentração de soluto são menos evidentes durante o resfriamento rápido. A criopreservação deve, portanto, objetivar uma taxa de resfriamento ótima que promova a harmonização desses aspectos (LEMMA, 2011).

Outra etapa que afeta diretamente a função espermática é o descongelamento. A curva de descongelamento ideal depende da curva utilizada para o congelamento. Espermatozoides congelados numa curva lenta devem ser descongelados lentamente para que ocorra tempo suficiente para o descongelamento dos cristais de gelo e conseqüente rediluição dos solutos extracelulares, reidratando a célula (AMANN & PICKETT, 1987). Já as curvas rápidas de congelamento exigem que os espermatozoides sejam descongelados rapidamente a fim de que o gelo intracelular não tenha tempo de sofrer recristalização (GRAHAM, 1996; SQUIRES et al., 1999)

Numa tentativa de superar esses problemas, o uso de agentes crioprotetores tem sido investigado, uma vez que eles aumentam o sucesso da criopreservação por melhorar as condições do ambiente ao qual os espermatozoides estão expostos, minimizando os danos às membranas e impedindo os mecanismos de capacitação espermática e reação acrossomal prematuras (LOOMIS & SQUIRES, 2005). Porém, embora imprescindíveis para a sobrevivência celular no processo de congelamento, alguns crioprotetores possuem efeitos tóxicos para os espermatozoides (BALL & VO, 2001), tornando essas substâncias utilizadas na criopreservação de outros tipos celulares impróprias para a célula espermática (WATSON, 2000). Em elevadas concentrações, os crioprotetores podem reduzir a capacidade fertilizante dos espermatozoides devido à lesão por danos osmóticos (GRAHAM, 1996), alterações térmicas, mecânicas, químicas e danos oxidativos com alterações

de membrana e DNA (PARKS & GRAHAM, 1992; WATSON, 2000), inerentes ao processo de criopreservação.

## 2. CRIOPROTETORES

A descoberta de agentes crioprotetores permitiu maior compreensão acerca do mecanismo de congelamento celular. Até então, os protocolos de sucesso dependiam da supressão da formação de gelo extracelular a partir da adição de agentes químicos (LUYET & HODAPP, 1938) e resfriamento rápido (LUYET & GEHENIO, 1940) para produzir o que foi então denominada vitrificação – uma transição do estado líquido para um estado vítreo (livre de gelo, porém estável). Com o entendimento de que a água intracelular era a fonte de formação de gelo prejudicial à célula, proposto por Luyet & Gehenio (1940), aliado aos resultados positivos obtidos por Polge et al. (1949) ao utilizar glicerol no congelamento de sêmen de galo, iniciou-se um extenso desenvolvimento de técnicas de criopreservação de células espermáticas de diversas espécies.

Os crioprotetores são componentes que atuam especificamente na manutenção da viabilidade celular durante o processo de congelamento/descongelamento (GILMORE et al., 1997). A habilidade de um componente agir de forma eficiente como crioprotetor depende de sua capacidade de proteção às células contra danos térmicos e ter baixo potencial de toxicidade, sendo essa capacidade dependente do número de pares de cadeias simples de elétrons que ele contém, a simetria esférica destas cadeias e sua solubilidade na água (NASH, 1966).

Esses agentes são classificados de acordo com o mecanismo de ação nas células. Substâncias permeáveis, como o glicerol, são conhecidas como agentes crioprotetores intracelulares, que atravessam as membranas celulares, promovendo a desidratação e evitando a formação de cristais de gelo no interior das células. Por outro lado, moléculas que não permeiam as células são consideradas crioprotetores extracelulares, com a função de auxiliar na desidratação intracelular e alterando a formação dos cristais para um tamanho

e formato inócuo (NASH, 1966; PICKETT & AMANN, 1993; LEIBO & BRADLEY, 1999).

## 2.1. Crioprotetores permeáveis

Os crioprotetores permeáveis atuam de acordo com suas propriedades coligativas com a água. As ligações de hidrogênio formadas entre água e crioprotetor alteram a orientação desta nos cristais de gelo, limitando a sua formação e retardando o crescimento dos cristais (NASH, 1966; ROWE, 1966; WATSON, 1979). Além disso, estes agentes diminuem o ponto crioscópico intracelular, de forma a manter maior quantidade de água no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos e propiciando ambiente menos deletério à célula espermática durante o congelamento (WATSON, 1995). Segundo Nash (1966), o crioprotetor permeável ideal deve apresentar baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular.

Segundo Ashwood-Smith (1987), compõem a classe de agentes crioprotetores permeáveis, os álcoois e as amidas. Ambos apresentam características inerentes a um bom crioprotetor (MEDEIROS et al., 2002) e vêm sendo amplamente testados no congelamento de sêmen de garanhões.

### 2.1.1. Glicerol

O glicerol foi o primeiro crioprotetor utilizado com sucesso (POLGE et al., 1949) e continua sendo o agente de escolha para o congelamento de sêmen da maioria das espécies (WATSON, 1995; FARSTAD, 1996), incluindo a equina (ALVARENGA et al., 2005). Trata-se de um álcool poli-hídrico, com seis sítios de ligação com a molécula de água (SILVA et al., 2003) e, mesmo possuindo baixa permeabilidade (GLAZAR et al., 2009) em comparação a outros crioprotetores, ele é considerado eficiente por tornar mais lenta a desidratação celular durante a criopreservação ao se ligar fortemente à água (DOEBBLER, 1966). Sua ação como solvente reduz o ponto de congelamento da água, permitindo a formação de canais descongelados e diluindo as altas concentrações de sais intracelulares (GRAHAM, 1996; SQUIRES et al., 1999), diminuindo a pressão osmótica do meio resfriado (SALAMON & MAXWELL,

1995). Além disso, o glicerol atua na membrana espermática, reduzindo sua fluidez e alterando sua permeabilidade (PARKS & GRAHAM, 1992).

Porém, 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), frequentemente em função da sua toxicidade (SLAVICK, 1987; AMANN & PICKETT, 1987). Esse efeito é dose dependente e pode levar à desnaturação proteica, despolimerização e redistribuição da actina, redução da despolarização mitocondrial e lesões na membrana plasmática (MACIAS-GARCIA, 2012), como resultado do choque osmótico ocorrido durante o descongelamento (MORRIS et al., 2007; 2012). Hammerstedt & Graham (1992) também relataram efeitos associados à toxicidade do glicerol no congelamento de sêmen de galos: mudanças nos eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade intracelular, alteração da polimerização da tubulina, alteração da associação dos microtúbulos, efeitos no balanço bioenergético, alteração direta na membrana plasmática, alteração do glicocálix e proteínas superficiais da célula espermática. A sensibilidade do espermatozoide a efeitos tóxicos varia entre as espécies e de acordo com a curva de congelamento utilizada, presença de outros componentes no meio e método de envasamento (WATSON, 1995).

Devido à sua alta toxicidade, a concentração de glicerol deve estar entre a mínima necessária para promover a proteção, e a máxima permitida para não causar danos aos espermatozoides (COTORELLO & HENRY, 2002). Em bovinos, a concentração utilizada varia entre 7 e 9 %; em caprinos, de 3 a 4 %, em cães, de 2 a 10 %; e em humanos, de 5 a 10 % (FARSTAD, 1996). Em equinos, existem grandes variações nas concentrações de glicerol utilizadas, mas em geral considera-se necessária uma quantidade inferior àquela utilizada em bovinos (KEITH, 1998), o que varia entre 2 e 5 % (LOOMIS et al., 1983; VIDAMENT et al., 2000, 2001; LOOMIS & GRAHAM, 2008), embora recentemente, Macias-Garcia et al (2012) tenham sugerido que a concentração de glicerol nos diluidores não deva superar 2,5 %.

### 2.1.2. Dimetilsulfoxido (DMSO)

Desde que Lovelock & Bishop (1959) descreveram o DMSO como sendo superior que o glicerol no congelamento de eritrócitos, ele vem sendo utilizado como agente crioprotetor único ou em associação com outros crioprotetores (SNEDEKER & GAUNYA, 1970; SINGH et al., 1995; KUNDU et al., 2000, 2002; HAN et al., 2005).

O DMSO é um composto que age como doador de prótons em ligações de hidrogênio, conferindo-lhe alta afinidade com a água. Por isso é considerado um solvente atrópico, bipolar e altamente hidrocópico, atuando como agente permeável que aumenta a estabilidade da membrana plasmática (SHERMAN, 1964; HOLT et al., 1992), protegendo as células contra eventuais danos causados pela criopreservação (KUNDU et al., 2000). Segundo Chenier (1999), o DMSO possui baixa permeabilidade à membrana plasmática quando comparado a outros agentes crioprotetores da classe dos álcoois e aumenta a permeabilidade da membrana à água, o que pode resultar em menor número de cristais de gelo intracelular durante o resfriamento, com consequente redução de injúrias espermáticas. Apesar de o mecanismo de ação não estar totalmente elucidado na célula espermática, é sabido que o DMSO interage com os fosfolípídeos estruturais da membrana espermática, mantendo a propriedade de transporte de água em temperaturas abaixo do 0 °C, reduzindo a formação de cristais de gelo, por diminuir o ponto de congelamento do fluido intracelular durante o processo de criopreservação (THIRUMALA et al., 2006). Além disso, o DMSO apresenta toxicidade reconhecidamente baixa, segundo Stone et al. (1993).

Esse agente foi utilizado com sucesso no congelamento de sêmen de touros (SNEDEKER & GAUNYA, 1970), caprinos (KUNDU et al., 2001), peixes (VIVEIROS & GODINHO, 2009; SILVA & GUERRA, 2011) e coelhos (VICENTE & VIUDES-DE-CASTRO, 1996; DALIMATA & GRAHAM, 1997), mas demonstrou ser tóxico para espermatozoides de cães (SONGSASEN et al., 2002). Na espécie equina, ao ser adicionado em concentrações entre 1 a 9 %, combinado ou não com o glicerol, apresenta maior viabilidade espermática pós-descongelamento quando congelado com 5 % de DMSO, sendo este protocolo superior ao do uso isolado de glicerol (KEITH, 1998). Metcalf et al. (2008) apresentaram resultados superiores em relação à motilidade espermática,

integridade acrossomal e de cromatina quando congelaram sêmen de garanhões com 1 M de DMSO quando comparado com 3,5 % de glicerol. E, em estudo realizado por Chenier (1999), garanhões que não apresentaram bom congelamento com glicerol, apresentaram melhores características pós-descongelamento com 1; 1,5 e 2 M de DMSO.

### 2.1.3. Etilenoglicol

Embora o etilenoglicol seja um dos crioprotetores de escolha para vitrificação de embriões bovinos, poucos estudos demonstram sua opção para o congelamento de sêmen (SQUIRES et al., 2004). Seu mecanismo de ação se assemelha ao de outros crioprotetores permeáveis e permeia a membrana de diferentes espécies mais rapidamente que o glicerol (PHELPS et al., 1999), resultando em menor condutividade hídrica com redução do estresse osmótico sofrido durante o processo de criopreservação (GILMORE et al., 1995). Seu peso molecular é menor que o do glicerol (62 g/mol x 92 g/mol) e ofereceu maior proteção de acrossoma e membrana de espermatozoides ovinos, quando comparado ao glicerol (MORAES et al., 1998). Porém, quando utilizado em concentrações elevadas, este álcool também apresenta efeito deletério na criopreservação espermática (BITTENCOURT et al., 2004), devendo portanto ser utilizado em concentrações menores àquelas usualmente utilizadas de glicerol (MORAES et al., 1998).

O uso de etilenoglicol tem apresentado vantagens frente ao glicerol e ao dimetilsulfóxido em diluentes para sêmen equino e em pequena escala para sêmen bovino, de acordo com observações de Guthrie et al. (2002). Segundo Ball & Vo (2001), o etilenoglicol apresenta menos efeitos deletérios que o glicerol em relação à motilidade e viabilidade espermática. Em estudo conduzido por Madeira et al. (2013), o uso do etilenoglicol combinado com a gema de ovo possibilitou maiores percentuais de espermatozoides de touros com morfologia normal e integridade de membrana plasmática em relação ao glicerol-gema. Porém, a utilização do etilenoglicol frequentemente tem apresentado resultados semelhantes ao glicerol, podendo ser utilizado no congelamento de sêmen de cães (PEREIRA et al., 2002), garanhões (ALVARENGA et al., 2000; MANTOVANI et al., 2002) e búfalos (ABDEL-KHALEK et al., 2008).

#### 2.1.4. Amidas

As amidas são crioprotetores permeáveis derivados de ácido carboxílico e amina, que apresentam três sítios de ligação com a molécula da água. Entretanto, apresentam menor peso molecular, viscosidade e solubilidade em água quando comparada ao glicerol, o que lhes confere maior permeabilidade à membrana espermática (NASH, 1966) e reduz as lesões causadas em função do estresse osmótico (ALVARENGA et al., 2005). Segundo Squires et al. (2004) e Alvarenga et al. (2005), as amidas conferem proteção estrutural e funcional aos espermatozoides criopreservados. Além disso, esses compostos podem apresentar benefícios para gananhões reconhecidamente “maus congeladores”, consistindo em alternativa promissora para o congelamento de sêmen nessa espécie (ALVARENGA et al., 2005).

Amidas como acetamida e lactamida apresentaram resultados superiores ao glicerol para a criopreservação de espermatozoides de coelhos (KASHIWAZAKI et al., 2006; OKUDA et al., 2007). Em contrapartida, quando adicionadas aos espermatozoides de equinos, amidas como a acetamida e a formamida apresentaram reduzido efeito protetor, o que comprova a existência de diferenças espécie-específicas, bem como individuais, da ação das amidas como crioprotetores (SQUIRES et al., 2004). Dentre aquelas que apresentam melhores resultados no congelamento de sêmen equino encontram-se a metilformamida e dimetilformamida. De acordo com Keith (1998), a adição de grupos metil em moléculas como a acetamida e a formamida tornaram mais efetivos os efeitos quanto à capacidade crioprotetora; o que ocorre em função do aumento da permeabilidade à membrana (BIANCHI et al., 2008).

Keith (1998), ao comparar as diferentes amidas (formamida, metilformamida, dimetilformamida, acetamida e metilacetamida) com o glicerol para congelamento de sêmen de gananhões, relatou superioridade da metilformamida em relação à motilidade pós-descongelamento e na preservação da viabilidade celular. Resultados semelhantes foram relatados por Medeiros (2003), ao comparar glicerol com dimetilacetamida, metilformamida e dimetilformamida, embora essa última tenha apresentado os melhores resultados. Em estudo conduzido por Gomes et al. (2002) com gananhões Mangalarga Marchador, os resultados pós-descongelamento foram

superiores nos grupos tratados com dimetilformamida e metilformamida em comparação ao glicerol e dimetilacetamida.

Com isso, a dimetilformamida tem sido objeto de estudo de diversos autores não só por apresentar resultados de crioproteção similares ou mesmo superiores ao glicerol (ALVARENGA et al., 2000; GOMES et al., 2002; HENRY et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002; MOFFET et al., 2003; SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005; OLACIREGUI et al., 2014), mas como por acarretar em efeitos benéficos quando utilizada em sêmen de garanhões cujas taxas pós-descongelamento resultaram em baixa sobrevivência espermática (MESA & HENAO, 2012). No entanto, sua concentração ideal permanece indeterminada.

### 3. INCLUSÃO DE COLESTEROL NA MEMBRANA PLASMÁTICA

Durante o resfriamento, a membrana passa por uma mudança de fase líquida para estado cristalino gel. Cada tipo de lipídeo passa pela fase de transição numa determinada temperatura: com isso, a membrana, que é composta por vários tipos de lipídeos diferentes, passa pela fase de transição ao longo de uma fase relativamente ampla de temperatura. No estado gel, as cadeias de fosfolipídeo alongam-se, o que resulta em membrana mais ordenada onde o movimento lipídico e proteico fica restrito (AMANN & PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990). Além disso, as proteínas integrais são excluídas dos domínios cristalinos no interior da membrana, de modo que muitas interações entre proteínas e lipídeos são perdidas e aglomerados proteicos se formam nos domínios lipídicos líquidos remanescentes. Como resultado dessas alterações, a membrana torna-se instável e sua funcionalidade é perdida (AMANN & PICKETT, 1987).

Tanto a relação colesterol:fosfolipídeo quanto o conteúdo de ácidos graxos insaturados que compõem a cadeia fosfolipídica são determinantes da fluidez da membrana (AMANN & PICKETT 1987). Aquelas espécies cujos espermatozoides possuem membrana plasmática com maiores concentrações de ácidos graxos insaturados e alta relação colesterol:fosfolipídeo são conhecidas como resistentes ao choque térmico, que é o caso de

espermatozoides de humanos, coelhos e galos (WATSON, 1981). Isso ocorre por que o colesterol estabiliza a membrana, em função da sua interação com as cadeias de ácidos graxos (WATSON, 1981) e mantem um arranjo lamelar aleatório de fosfolipídeos em temperaturas reduzidas (AMANN & PICKETT, 1987), ajudando a minimizar ou eliminar a fase de transição (GRAHAM & FOOTE, 1987).

Diante disso, foi sugerido que a inclusão de colesterol ao meio diluidor aumentaria a viabilidade e longevidade de espermatozoides (WHITE, 1993). Estudos relativos à utilização de lipossomas visando solubilizar o colesterol para incorporá-lo à membrana apresentaram resultados variados (PARKS et al., 1981; OLLERO et al., 1996; WILHELM et al., 1996). Recentemente, as ciclodextrinas têm sido utilizadas para inserção ou remoção de colesterol de membranas biológicas ou sintéticas (MOCÉ et al., 2010).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos obtidos a partir da degradação enzimática do amido e possuem caráter anfipático por apresentarem face externa hidrofílica e uma cavidade interna hidrofóbica (DOBZIUK, 2006) que pode encapsular compostos insolúveis tais como o colesterol. Estas moléculas possuem elevada afinidade para os esteróis e, em condições *in vitro*, são eficientes na remoção de colesterol das membranas de muitos tipos celulares (CHRISTIAN et al., 1997), incluindo espermatozoides (VISCONTI et al., 1999; COMPANYÓ et al., 2007). Além disso, se forem pré-carregadas com o colesterol, podem inseri-lo em membranas celulares (NAVRATIL et al., 2003).

As formas mais comuns de ciclodextrina possuem de seis a oito unidades glicosídicas, designadas alfa, beta ou gama ciclodextrinas (SAENGER, 1980). Destas, a  $\beta$ -ciclodextrina é a que apresenta maior afinidade por compostos lipídicos, especialmente o colesterol (YANCEY et al., 1996; CHRISTIAN et al., 1997). No entanto, a adição de grupamentos metil à molécula da ciclodextrina aumenta tanto sua solubilidade em água quanto sua capacidade de solubilizar compostos hidrofóbicos (YANCEY et al., 1996). A incorporação de colesterol à metil- $\beta$ -ciclodextrina apresenta melhores resultados quanto à motilidade espermática quando comparada a outros tipos de ciclodextrinas (GRAHAM, 1998; COMBES et al., 2000), embora a 2-

hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina tenha sido efetiva em espermatozoides de ovinos (MOCÉ et al., 2010).

As concentrações utilizadas na incubação de espermatozoides com ciclodextrinas variam entre 1 e 2 mg /  $1,2 \times 10^8$  espermatozoides, para a maioria das espécies (PURDY & GRAHAM, 2004; MOORE et al., 2005; MOCÉ & GRAHAM, 2006; PURDY et al., 2010) e a incubação a temperatura ambiente por 15 minutos é suficiente para a inclusão do colesterol à membrana espermática, embora em alguns estudos a incubação tenha sido realizada por mais de 3 horas e ou temperaturas mais elevadas (PURDY & GRAHAM, 2004; MOCÉ & GRAHAM, 2006; DE GRAAF et al., 2007). No entanto, é importante que a incubação seja feita em meio livre de gema de ovo ou leite desnatado, uma vez que esses componentes interferem na transferência do colesterol para a membrana espermática (COMBES et al., 2000; PURDY & GRAHAM, 2004).

O tratamento de espermatozoides com ciclodextrina carregada com colesterol tem se mostrado eficiente na incorporação do colesterol na membrana plasmática, por aumentar seu conteúdo em duas a três vezes em espermatozoides de bovinos, garanhões e ovinos (PURDY & GRAHAM, 2004; MOORE et al., 2005; MOCÉ et al., 2010). Além disso, a incubação de sêmen ovino e suíno com esse aditivo exerceu efeito benéfico contra choque por frio (MORRIER et al., 2004; GALANTINO-HOMER et al., 2006) e reduziu a fosforilação da tirosina e reação acrossomal, além de melhorar a viabilidade celular (BAILEY et al., 2008).

De maneira geral, o tratamento com ciclodextrina carregada com colesterol antes da criopreservação melhora as taxas de sobrevivência espermática avaliadas por motilidade e viabilidade (PURDY & GRAHAM, 2004; MOORE et al., 2005; MOCÉ & GRAHAM, 2006; MOCÉ et al., 2010). Embora, o incremento observado nessas características seja variável entre os estudos, a maioria dos autores relatam aumentos de 10 a 20%.

#### 4. ESTRESSE OXIDATIVO

A célula espermática, como quaisquer outras que sobrevivam em condições de aerobiose, produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), resultantes da atividade metabólica normal (LAMIRANDE et al., 1997). As ROS que geram maiores implicações na biologia reprodutiva e na fertilização são representadas pelo ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroxila ( $OH^-$ ), altamente reativo, e o radical peroxila ( $ROO^-$ ) (SIKKA, 1996; MANEESH e JAYALEKSHMI, 2006). Além destes, existem ainda os oxidantes derivados do nitrogênio, que podem ser denominados de RNS (TURRENS, 2003), com destaque para o óxido nítrico ( $ON^-$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).

O ânion superóxido é a principal ROS gerada pelos espermatozoides equinos, sendo um radical de vida curta que é dismutado via enzimática a peróxido de hidrogênio, que por sua vez é considerado a ROS mais deletério à célula espermática. A produção de ânion superóxido é mediada pela enzima NADPH oxidase (NOX5) presente na membrana plasmática da cabeça ou mitocondrial dos espermatozoides (BURNAUGH, 2007).

Quando produzidas em pequenas quantidades, as ROS são fisiologicamente importantes por promover a cascata de fosforilação da tirosina, associada à capacitação. Porém, quando a sua produção excede a capacidade de defesa antioxidante da célula, instala-se o estresse oxidativo, caracterizado por peroxidação da membrana espermática e danos importantes ao DNA celular (GUTHRIE & WELCH, 2012). Além disso, o estresse oxidativo não só diminui a fertilidade espermática como prejudica a capacidade desses espermatozoides em gerarem embriões viáveis (AITKEN et al., 2010).

Durante o congelamento, os efeitos deletérios do estresse oxidativo são desencadeados tanto pela retirada da maior parte do plasma seminal, o qual possui grande capacidade antioxidante (BUSTAMANTE et al., 2006), quanto pelo estímulo à produção de ROS durante a criopreservação (WATSON, 2000). As principais enzimas que degradam as ROS são a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx), particularmente abundantes no plasma seminal de garanhões (BAUMBER et al., 2005; STRADIOLI et al., 2006). Além destas, outros componentes do plasma seminal atuam de forma a

degradar as ROS, tais como: albumina, taurina, hipotaurina, piruvato, lactato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotina (BALL, 2011).

A fim de melhorar a qualidade do sêmen criopreservado por meio da prevenção ou redução do processo peroxidativo, diversos pesquisadores têm-se dedicado a realizar estudos relacionados à adição de antioxidantes nos diluidores seminais das diversas espécies (MARQUES et al., 2002; KHERADMAND et al., 2006; SILVA, K. et al., 2009; CÂMARA et al., 2011; SILVA, S. et al., 2011; SILVA, E. et al., 2012). O uso de antioxidantes exógenos no sêmen tem determinado resultados favoráveis, como a redução da concentração de malonaldeído (MDA) nas amostras seminais em decorrência da redução da peroxidação lipídica e, em virtude disto, menos danos espermáticos e melhor conservação celular durante o processo de criopreservação (SARLÓS et al., 2002). Entretanto, apesar de os antioxidantes reduzirem as taxas de peroxidação dos fosfolípidios endógenos dos espermatozoides (JONES & MANN, 1976), a terapia com esses aditivos pode apresentar efeitos indesejáveis se a dose de segurança for ultrapassada pelo fato de inibirem a formação das ROS e suas funções fisiológicas desempenhadas nos espermatozoides (CARVALHO et al., 2002), a exemplo da hiperativação, capacitação e reação acrossomal (LAMIRANDE et al., 1997; SANOCKA & KURPISZ, 2004).

## 5. ANTIOXIDANTES FLAVONOIDES

As antocianinas são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides, que possuem estrutura química adequada para a ação antioxidante (PRIOR, 2003) em decorrência da presença de vários grupos hidroxila, o que os torna mais potentes do que as vitaminas C e E (BARREIROS et al., 2006). Elas constituem um grupo de pigmentos naturais de frutas vermelhas e hortaliças escuras, com grande concentração na casca de uvas, jabuticabas e açaí (DOWNHAM & COLLINS, 2000; POZO-INSFRAN et al., 2004; SILVA, 2011).

O uso de compostos fenólicos na criopreservação seminal é baseado nas propriedades de oxirredução dessas substâncias, que podem

desempenhar importante papel na absorção e na neutralização das ROS decompondo os peróxidos (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004), o que, por sua vez, pode prevenir a ocorrência de danos espermáticos (SIKKA, 2004).

Em contrapartida, é importante ressaltar que cada flavonoide possui efeito biológico dependente de sua estrutura, dose e via de administração, fatores que podem determinar resultados variáveis após sua utilização (LIMA et al., 2001), justificando a não proteção das células e tecidos pelos compostos fenólicos, diante de todos os danos oxidativos sofridos (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Além disso, tais compostos podem apresentar atividade pró-oxidante, a exemplo do que ocorre com a quercetina ao reagir com o ferro (BIANCHI & ANTUNES, 1999), sendo tal atividade evidenciada, especialmente, em compostos que possuem potencial de oxidação menor que o do  $Fe^{3+}$  e do  $Cu^{2+}$  (BARREIROS et al., 2006).

A quercetina é um polifenol flavonoide que possui efeito inibidor da peroxidação lipídica similar e sinérgico ao do resveratrol, um polifenol não flavonoide (STOJANOVIC et al., 2001). Além disso, a quercetina possui comprovada capacidade inibidora de danos oxidativos induzidos pelo  $H_2O_2$  no DNA de linfócitos humanos (BIANCHI & ANTUNES, 1999). Em função disso, foi gerada a perspectiva de que a quercetina pudesse exercer efeito protetor sobre os espermatozoides, fato não confirmado em estudo realizado por Silva et al. (2012) ao congelarem o sêmen ovino com diferentes concentrações de quercetina, embora suponha-se que este antioxidante tenha promovido redução da peroxidação lipídica. Por outro lado, em estudo realizado por Zribi et al. (2012) com sêmen humano, foi observado que a adição de quercetina ao diluidor seminal aumentou a motilidade e viabilidade espermática, bem como reduziu a fragmentação do DNA e a oxidação após descongelamento do sêmen.

De maneira semelhante, em função das propriedades biológicas das antocianinas como potente antioxidante (BANERJEE & DASGUPTA, 2005), ação anti-inflamatória, de inibição da agregação plaquetária, de inibição da oxidação do colesterol LDL, além da atividade antimicrobiana (SILVA, 2003), Ramos (2012) sugeriu que a adição desse composto ao diluente de congelamento de sêmen de caprinos, tenha contribuído na melhora da preservação da integridade de membranas e aumento na motilidade

espermática pós-descongelamento. Porém, Pinho et al. (2014) não observaram efeitos benéficos na qualidade espermática frente à adição de antocianina em diferentes etapas do processo de criopreservação de sêmen suíno, sugerindo novas concentrações e tempos de incubação com os espermatozoides a serem testadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-KHALEK, E. A.; SHALABY, N. A.; EID, L. N.; GBR, A. A. Effect of various types and levels of cryoprotectants on sperm motility during freezing processes of Egyptian buffalo semen. **Journal of Agricultural Science**, v. 33, p.7159-7171. 2008.
- 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.; 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.
- ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MOREIRA, R. M.; CESARINO, M. M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, p. 541-545. 2000.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds.). **Equine Reproduction**. Malvern: Lea & Fabiger, p. 715-745. 1993.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a 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.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: SYMPOSIA OF THE SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, 1987, Cambridge. **Proceedings....** Cambridge: Biologists Ltda, 1987. p. 395-406.
- AURICH, J.; AURICH, C. Developments in European horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. **Reproduction in Domestic Animals** , v. 41, p. 275-279, 2006.
- BALL, B. A. Oxidative stress in sperm. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. (Eds) **Equine Reproduction**. 2<sup>a</sup> ed. Wiley Blackwell, 2011. p.991-995.
- BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, p.1061-1069. 2001.

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

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N.; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, v. 90, p. 727-733. 2005.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R. **Panorama da inseminação artificial em bovinos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste. 2008. 28 p.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123. 2006.

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

BAILEY, J. L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRÉQUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINO-HOMMER, H. L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v. 70, p. 1251–1259. 2008.

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.

BIANCHI, M. L. P; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130. 1999.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO, A.L.; SANTOS, A.D.F.; FURST, R.; TEIXEIRA, R.B.S.; CHALHOU, M.; PORTELA, A.P.; ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; GUIMARÃES, J.D. Utilização de glicerol e etileno glicol 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.

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.

CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; GUERRA, M.M. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v. 76, p. 342-350. 2011.

CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, p. 33-38. 2002.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. **Theriogenology**, v. 72, p. 930-948. 2009.

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

CHENIER, T. S. **Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of stallion spermatozoa**. 1999. 150 p. Thesis (Doctor in Veterinary Science) - Faculty of Graduate Studies, University of Guelph, Ottawa, Canada, 1999.

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

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.

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

COMPANYÓ, M.; IBORRA, A.; VILLAVARDE, J.; MARTÍNEZ, P.; MORROS, A. Membrane fluidity changes in goat sperm induced by cholesterol depletion using beta-cyclodextrin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 2246-2255. 2007.

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

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

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, p. 831-841. 1997.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 33-40. 2004.

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

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

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

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p.5-22. 2000.

DUNCAN, A. E.; WATSON, P. F. Predictive water loss curves for ram spermatozoa during cryopreservation: comparison with experimental observation. **Cryobiology**, v. 29, p. 95-105. 1992.

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

GALANTINO-HOMER, H .L.; ZENG, W. X., MEGEE, S. O.; DALLMEYER, M.; VOELKL, D.; DOBRINSKI, I. Effects of 2-hydroxypropylbeta-cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 638-650. 2006.

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.

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

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 & analysis of sperm function. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, **Proceedings...** Baltimore: Society for Theriogenology, 1998. p. 54-59.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147. 1996.

GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effects of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull sperm after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, p. 42-52. 1987.

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

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1806-1811. 2002.

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

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88. 1990.

HAN, X. F.; NIU, Z. Y.; LIU, F. Z.; YANG, C. S. Effect of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, p. 197-201. 2005.

HENRY, M.; SNOECK, P. P. N.; COTTORELLO, A. C. P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants, **Theriogenology**, v. 58, p. 245-248. 2002.

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

JONES, R.; MANN, T. Lipid peroxidation in spermatozoa; formation, role of plasmalogen, and physiological significance. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 193, p. 317-333. 1976.

KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, p.511-516. 2006.

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

KHERADMAND, A.; BABAEI, H.; ABSHNAS, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants on the chilled stored ram semen. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 7, p. 40-45. 2006.

KUNDU, C. N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G. C. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. **Reproduction**, v. 123, p. 907-913. 2002.

KUNDU, C. N.; DAS, K.; MAJUMDER, G. C. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. **Cryobiology**, v. 41, p. 21-27. 2001.

KUNDU, C. N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G. C. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, p. 117-125. 2000.

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

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

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

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; STRINGHETA, P. C.; TINOCO, A. L. A.; SILVA, J. F. Bixina, Norbixina e Quercetina e seus efeitos no metabolismo lipídico de coelhos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, p. 196-200. 2001.

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

LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. In: CARNEVALE, E. M. **Veterinary Clinics North America – Equine Practice**, p. 663-676. 2006.

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

LOOMIS, P. R.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straws. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 687-693. 1983.

LOVELOCK, J. E.; BISHOP, M. W. H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulphoxide. **Nature**, v. 183, p. 1394-1394. 1959.

LUYET, B.; GEHENIO, M. **Life and death at low temperatures**. Normandie: Biodynamica, 1940.

LUYET, B.; HODAPP, E. Revival of Frog's Spermatozoa Vitrified in Liquid Air. In: SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE, 1938, New York. **Proceedings...** New York, 1938. v.39, p. 433-434.

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

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.

MANTOVANI, R.; ROTA, A.; FALOMO, M. E.; BAILONI, L.; VINCENTI, L. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: sperm quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 217-226. 2002.

MANEESH, M.; JAYALEKSHMI, H. Role of reactive oxygen species and antioxidants on pathophysiology of male reproduction. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21, p. 80-89, 2006.

MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; GOBESSO, A. A. O.; NEVES NETO, J. R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260. 2002.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiology**, v. 247, p.125-142. 1984.

MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**, v. 168, p. 939-949. 1970.

MEDEIROS, A. S. L. **Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões**. 2003. 123 f.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2003.

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

MESA, A.; HENAO, G. Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros postdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. **Revista MVZ Córdoba**, v. 17, p. 2908-2915. 2012.

METCALF, E. S.; DIDEON, B. A.; BLEHR, R.; SCHLIMGEN, T.; BERTRAND, W.; VARNER, D. D.; TEAGUE, S. R.; HAUSMAN, M. S. Effects of DMSO and L-Ergothioneine on post-thaw semen parameters in stallions: Preliminary results. **Animal Reproduction Science**, Abstract, v. 107, p. 31-32. 2008.

MOCÉ, E.; PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 236-247. 2010.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 826-833. 2006.

MOFFET, P. D.; BRUEMMER, J. E.; CARD, C.; SQUIRES, E. L. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. In: **Proceedings of Society for Theriogenology Annual Conference**, Columbus, 2003. p. 42.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v. 51, p. 241-249. 2005.

MORAES, C.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; SCHWEITZER, C.M. Criopreservação do sêmen ovino em pellets com etilenoglicol. **Ciência Rural**, v.28, p.287-292. 1998.

MORRIER, A.; THÉRIAULT, M.; CASTONGUAY, F.; BAILEY, J. Effect of cholesterol loaded methyl-b-cyclodextrin on ram sperm during cryopreservation, cold-shock and artificial insemination. In: SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION MEETING, 2004, Vancouver. **Proceedings...** Vancouver, 2004, p. 239.

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

MORRIS, G. J.; FASZER, K.; GREEN, J. E.; DRAPER, D.; GROUT, B. W. W.; FONSECA, F. Rapidly cooled horse spermatozoa: Loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation **Theriogenology**, v. 68, p. 804-812. 2007.

NAVRATIL, A. M.; BLISS, S. P.; BERGHORN, K. A.; HAUGHIAN, J. M.; FARMERIE, T. A.; GRAHAM, J. K.; CLAY, C. M.; ROBERSON, M. S. Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 31593-31602. 2003.

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

OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T.; KAMIJO, S.; KASHIWAZAKI, N. Fertility of spermatozoa cryopreserved with 2% acetamide or glycerol through artificial insemination in the Japanese white rabbit. **Experimental Animals**, v. 56, p. 29-34. 2007.

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

OLLERO, M.; MUINÑO-BLANCO, T.; LÓPEZ-PÉREZ, M. J.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system: effect of different cryoprotectants. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 680, p. 157–164. 1996.

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.

PAPA, F. O.; MELO, C. M.; DELL'ÁQUA, J. A.; MACEDO, L. P.; CARVALHO, A. G.; ALVARENGA, M. A.; MEDEIROS, A. S. L. Inovações metodológicas na biotecnologia do sêmen equino resfriado e congelado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (Supp. 1), p.19-27, 2005.

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

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

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

PEREIRA, S. M.; RIGON, R. M.; MEZZALIRA, A.; CECIM, M. Ethylene glycol on canine semen cryopreservation. **Ciência Rural**, v. 32, p. 649-655. 2002.

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.

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

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. 3 p.

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

POZO-INSFRAN, D. D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of acai (*Euterpe oleracea* mart). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1539-1545. 2004.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal of Clinical Nutrition**, Suppl. 3, v. 78, p. 570S-578S. 2003.

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

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**. 2012. 40 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

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

SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 19, p. 344-362. 1980.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal Reproduction Science**, v.38, p.1-36. 1995.

SAMPER, J. C. Techniques for artificial insemination. In: YOUNGQUIST, R. S.; THREFFALL, W. R. (Eds) **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, 2a ed. Saint Louia: Saunders-Elsevier. 2007, p. 37-42.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 12-18. 2004.

SARLÓS, P.; MOLNÁR, A.; KÓKAI, M.; GÁBOR, G.; RÁTKY, J. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 50, p. 235-245. 2002.

SHERMAN, J. K. Dimethyl sulfoxide as a protective agent during freezing and thawing of human spermatozoa. In: SOCIETY FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICIN, 1964, New York. **Proceedings...** New York, 1964, v. 26, p. 261-264.

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

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 78-86. 1996.

SILVA, E. C. B.; CAJUEIRO, J. F. P.; SILVA, S. V.; SOARES, P. C.; GUERRA, M. M. P. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v. 77, p. 1722-1726. 2012.

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

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.370-384. 2011.

SILVA, S. V.; SOARES, A. T.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; NUNES, J. F.; PEIXOTO, C. A.; GUERRA, M. M. P. In vitro and in vivo evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 874-881. 2011.

SILVA, K. M. G.; MORAES, T. A. P.; SILVA, E. C. B.; GAMBOA, S. C.; GUERRA, M. M. P. Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides equinos após descongelamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 42-49. 2009.

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.C.F. **Propriedades antioxidantes in vitro da uva branca e da uva tinta e de seus respectivos vinhos elaborados**. 2003. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

SINGH, M. P.; SINHA, A. K.; SINGH, B. K. Effect of cryoprotectants on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, p. 1047-1053. 1995.

SLAVICK, T. Effect of glycerol on the penetrability of fresh ram spermatozoa with zone-free hamster eggs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, p. 99-103. 1987.

SNEDEKER, W. H.; GAUNYA, W. S. Dimethylsulphoxide as a cryoprotective agent for freezing bovine semen. **Journal of Animal Science**, v. 30, p. 953-956. 1970.

SONGSASEN, N.; YU, I.; MURTON, S.; PACCAMONTI, D. L.; EILTS, B. E.; GODKE, R. A.; LEIBO, S. P. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. **Cryobiology**, v. 44, p. 79-90. 2002.

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

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E.. **Cooled and Frozen Stallion Semen**. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University. 1999.

STOJANOVIC, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, p. 79-89. 2001.

STONE, R. W. Clinical updates on the use of dimethyl sulfoxide. **Canine Practice**, v.18, p.16-19. 1993.

STRADIOLI, G.; RUBEL, 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.

THIRUMALA, S.; CAMPBELL, W. T.; VICKNAIR, M. R.; TIERSCH, T. R.; DEVIREDDY, R. V. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. **Theriogenology**, v. 66, p. 964-973. 2006.

TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, Suppl., v. 27, p. 53–59. 1979.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, p. 335-344. 2003

VICENTE, J. S.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 36, p. 485-492. 1996.

VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTRON, S.; LE TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p.201-218. 2001.

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

VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMER, H.; NING, X.; MOORE, G. D.; VALENZUELA, J. P.; JORGEZ, C. J.; ALVAREZ, J. G.; KOPF, G. S. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 3235-3242. 1999.

VIVEIROS, A. T. M.; GODINHO, H. P. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 137-150. 2009.

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

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

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARK, A. (Eds). **Effects of Low Temperatures on Biological Membranes**. London: Academic Press, p. 189–218. 1981.

WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. **Reproductive Biology**, v. 1, p. 183-350. 1979.

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

WILHELM, K. H.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 33, p. 320-329. 1996.

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

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

YANCEY, P. G.; RODRIGUEZ, W. V.; KILSDONK, E. P. C.; STOUT, G. W.; JOHNSON, W. J.; PHILLIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 16026-16034. 1996.

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

YESTE, M.; ESTRADA, E.; PINART, E.; BONET, S.; MIRÓ, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. **Cryobiology**, v. 68, p. 251–261. 2014b.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; CASAS, I.; BONET, S.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. **Theriogenology**, v.79, p.929-939. 2013.

ZRIBI, N.; CHAKROUN, N. F.; ABDALLAH, F. B.; ELLEUCH, H.; SELLAMI, A.; GARGOURI, J.; REBAI, T.; FAKHFAKH, F.; KESKES, L. A. Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. **Cryobiology**, v. 65, p. 326-331. 2012.

# ASSOCIAÇÃO DE CRIOPROTETORES INTRACELULARES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES

## 1. INTRODUÇÃO

Embora o congelamento de sêmen seja um procedimento bem sucedido e amplamente difundido para a espécie bovina, a técnica encontra-se em fase de aperfeiçoamento em diversas outras espécies (OHASHI, 2001; SILVA et al., 2001). Na espécie equina, a inseminação artificial (IA) com sêmen congelado ainda não se encontra plenamente difundida em função da seleção genética de reprodutores, que é baseada fundamentalmente nas características morfofuncionais do animal e norteadas para a minimização de problemas decorrentes de endogamia. No entanto, a recente flexibilização de algumas associações de criadores de cavalos, ao permitirem o registro de potros gerados a partir do uso de sêmen congelado, gera uma crescente demanda na utilização dessa biotecnologia (ÁLVAREZ et al., 2014).

Em função desse cenário, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos eficientes de congelamento de sêmen equino, visando aumentar a capacidade de propagação de linhagens de animais consagrados (SCHERZER et al., 2009), e contribuindo, com isso, para o aumento da produtividade dos plantéis e lucros dos proprietários. No entanto, a preservação pós-descongelamento da motilidade espermática e os índices de fertilidade são variáveis individuais (VIDAMENT et al., 1997;. ALVARENGA et al., 2005;. VIDAMENT, 2005), especialmente em determinadas raças. Com isso, pesquisas voltadas para a otimização dos procedimentos de criopreservação incluem mudanças nas curvas de congelamento/descongelamento, modificações nas concentrações e temperaturas em que os crioprotetores são adicionados aos meios diluidores e variações de composição dos diluentes utilizados durante o processo (LEIBO et al., 2002).

Na espécie equina, o sêmen é usualmente congelado em soluções contendo glicerol em concentrações que variam de 2 a 5 % (LOOMIS et al., 1983; VIDAMENT et al., 2000, 2001; LOOMIS & GRAHAM, 2008). Embora seja o crioprotetor mais comumente utilizado, o glicerol produz danos osmóticos

celulares devido à sua permeabilidade (BALL & VO, 2001) que é menor que a da água e de outros crioprotetores (GLAZAR et al., 2009). Além disso, a toxicidade do glicerol provoca lesões espermáticas durante o processo de criopreservação (FAHY et al., 1990) e pode resultar em desnaturação de proteínas, alterações nas interações de actina e indução de lesões na membrana lipídica, resultando um efeito prejudicial sobre a fertilidade do sêmen (PACE & SULLIVAN, 1975; DEMICK et al., 1976). Conseqüentemente, as baixas taxas de motilidade espermática e fertilidade pós-descongelamento comumente verificadas no sêmen equino são frequentemente associadas à utilização desse agente como crioprotetor (ALVARENGA et al., 2005).

Os efeitos negativos associados ao glicerol têm incentivado pesquisadores a investigarem crioprotetores alternativos com propriedades semelhantes, porém com efeitos menos tóxicos (ÁLVAREZ et al., 2014). O crioprotetor é considerado ideal quando, ao penetrar a membrana plasmática, não provoca desidratação ou lesão celular, e, ao mesmo tempo, não seja tóxico nas concentrações necessárias para evitar esses eventos (FAHY, 1986; FAHY et al., 1987). Embora a toxicidade dos crioprotetores seja bem conhecida em pesquisas de vitrificação, parece haver menor consciência da relevância da toxicidade dos agentes crioprotetores por parte daqueles que usam o congelamento como método de criopreservação celular (FAHY, 2010).

Algumas pesquisas têm evidenciado que crioprotetores com menores pesos moleculares, tais como dimetilformamida (DMFA), são mais permeáveis do que o glicerol (GLAZAR et al., 2009), reduzindo assim o estresse osmótico e as injúrias sofridas pela célula espermática (PEÑA et al., 2011). O uso da DMFA tem apresentado resultados semelhantes (HENRY et al., 2002; SQUIRES et al., 2004) ou superiores (GOMES et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002; ALVARENGA et al., 2005; MEDEIROS, 2007; ARIFANTINI et al., 2010) ao do glicerol. Em relação à integridade de membrana (MEDEIROS, 2007; MESA & HENAO, 2012; GIBB et al., 2013), resistência osmótica (MEDEIROS, 2007) e fertilidade a campo (MOFFETT et al., 2003; MEDEIROS, 2007; OLIVEIRA et al., 2013), o uso de DMFA também tem se mostrado superior em comparação ao glicerol. Além disso, a DMFA foi relacionada a efeito benéfico sobre os espermatozoides de garanhões que demonstram baixas taxas de

sobrevivência pós-descongelamento (ALVARENGA et al., 2005; MEDEIROS, 2007).

O efeito da combinação entre diferentes concentrações de glicerol associado à dimetilformamida também tem sido estudado e demonstrado resultados semelhantes ao uso isolado da mesma (VIDAMENT et al., 2002; MEDEIROS, 2003; MORILLO-RODRIGUEZ et al., 2012; GIBB et al., 2013; ÁLVAREZ et al., 2014). Porém, na literatura consultada, não foram encontrados relatos relacionados às concentrações da associação de crioprotetores praticadas no presente estudo ou ainda quanto às variáveis analisadas pós-descongelamento.

Objetivou-se com o presente estudo comparar o efeito do glicerol e da dimetilformamida, na criopreservação de sêmen equino, em concentrações finais de 5 %, associados ou não, sobre a viabilidade espermática *in vitro* pós-descongelamento.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Delineamento Experimental**

Foram utilizados quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 4 e 15 anos, provenientes do Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa e do Haras JA, situado no município de Viçosa, Minas Gerais (latitude 20° 45' 20" Sul, longitude 42° 52' 53" Oeste, altitude média de 752 m). Todos os animais foram previamente 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). De cada reprodutor foram obtidos no mínimo cinco ejaculados, em intervalos de 48 horas, o que resultou em trinta partidas congeladas para os testes de viabilidade espermática *in vitro*. As coletas foram realizadas no período de junho a julho de 2013. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram realizados de forma a garantir que as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa fossem rigorosamente seguidas.

Durante o período experimental, os animais permaneciam alojados em baias de alvenaria de 16 m<sup>2</sup> com cama de capim gordura e eram soltos diariamente, individualmente, em piquetes de capim *coast cross* e tifton (*Cynodon* spp.), de 225 m<sup>2</sup>, no período das 07:00 às 14:00. A alimentação, oferecida duas vezes ao dia, consistiu em ração concentrada adequada para a categoria (garanhões em manutenção – 14% de proteína total – 1,0% do peso vivo), formulada segundo as recomendações do National Research Council (2007) e capim elefante, *coast cross* ou tifton com cana de açúcar picada (3,5% + 1% do peso vivo, respectivamente), sal mineral e água *ad libitum*. O controle de ecto e endoparasitas foi realizado de acordo com o programa sanitário do estabelecimento.

Para o congelamento dos ejaculados, foi utilizado o meio comercial Botu-Crio<sup>®1</sup> sem crioprotetor, constituindo esse o diluente base para os tratamentos 1 a 3. Os tratamentos testados diferiram quanto às proporções adicionadas dos crioprotetores dimetilformamida<sup>2</sup> e glicerol<sup>3</sup>, conforme segue:

- Tratamento 1 (GLIC): diluente base adicionado de glicerol (5 %)
- Tratamento 2 (DMFA): diluente base adicionado de dimetilformamida (5 %)
- Tratamento 3 (DG): diluente base adicionado de glicerol (2 %) e dimetilformamida (3 %)
- Tratamento 4 (BC): Botu-Crio<sup>®</sup> comercial (grupo controle – glicerol a 1% associado à metilformamida a 4 %)

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em ensaio fatorial (4 x 4).

## 2.2. Colheita de sêmen

O esgotamento das reservas extra-gonádicas de todos os garanhões foi obtido mediante colheitas de sêmen diárias, por cinco dias consecutivos seguidos por dois dias de descanso sexual (STICH et al., 2002). As colheitas foram realizadas com vagina artificial modelo Botucatu, previamente aquecida com água à 45 °C. Após cada colheita, foi retirada por filtração a fração gelatinosa do ejaculado e a avaliação imediata foi realizada considerando o

aspecto, coloração, volume, concentração espermática, motilidade espermática total e vigor espermático. O volume foi aferido em proveta graduada de 250 mL, previamente aquecida a 37 °C. A motilidade (%) e vigor (0 - 5) espermáticos foram observados em microscópio óptico, com aumento de 200 x, utilizando-se 20 µL de sêmen disposto entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C. Uma alíquota de 50 µL de sêmen foi diluída em 950 µL de solução formol-salina tamponada para determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer.

### 2.3. Congelamento de sêmen

Após as avaliações imediatas, o sêmen foi diluído em meio à base de leite desnatado<sup>4</sup> na proporção 1:1 e transferido para tubos Falcon de 15 mL para posterior centrifugação a 600 g por 15 minutos (SAMPAIO, 2012).

Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e a concentração do pélete calculada em câmara de Neubauer. Após a determinação da concentração espermática, o pélete foi então homogeneizado com o diluente de congelamento do respectivo tratamento para uma concentração final de 50 milhões de espermatozoides por mL (CLULOW, et al., 2008). As amostras foram envazadas em 10 palhetas francesas de 0,5 mL por tratamento, devidamente identificadas, e então, refrigeradas a 5 °C por 20 minutos, conforme Sampaio (2012). Após este período, as palhetas foram acondicionadas em vapor de nitrogênio, a 5 cm do nível da lâmina de nitrogênio líquido, por 15 minutos (LORENZONI, 2010) e posteriormente submersas em nitrogênio líquido, colocadas em raques e armazenadas em botijão criogênico.

### 2.4. Avaliação *in vitro* da viabilidade espermática

O descongelamento de sêmen foi realizado mediante imersão das palhetas em banho maria a 37 °C por 30 segundos, e avaliados imediatamente conforme descrito para avaliação do sêmen fresco. Além dessas, foram realizadas as seguintes avaliações pós-descongelamento:

#### 2.4.1. Teste de termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência foi realizado mediante avaliações subjetivas a motilidade espermática total e do vigor espermático, em microscópio óptico, nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos após o descongelamento, conforme Fürst (2006). As amostras permaneceram em teste enquanto apresentassem motilidade acima do limite inferior de 30%, quando então era considerado finalizado o teste para a amostra. Tal procedimento se deu em função do valor de referência para liberação de sêmen criopreservado para utilização em programas de inseminação artificial (CBRA, 2013).

#### 2.4.2. Citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo das amostras foi realizada em aparelho BD FACSVerser<sup>TM</sup> 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 (Long Pass 507 nm / Band Pass 527/32 nm), B (LP 560 nm / BP 568/42 nm), C (LP 665 nm / BP 700/54 nm), D (LP 752 nm / BP 783/56 nm), E (LP 660 nm / BP 660/10 nm) e F (LP 752 nm / BP 783/56 nm).

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

As amostras foram primeiramente analisadas sem corantes, para que assim fosse determinado o local específico onde se localizava a população espermática, sendo este estipulado como padrão para análise. Em seguida, as amostras foram coradas com as sondas de forma a identificar os espermatozoides marcados. Os testes foram repetidos até a obtenção de resultados coerentes com a viabilidade previamente conhecida do sêmen utilizado e, com isso, o melhor ajuste (compensação) obtido para cada sonda era estipulado como padrão.

#### 2.4.2.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (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 (MATYUS et al., 1984). Para avaliação da integridade acrossomal foi utilizada a aglutinina *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA), sonda incapaz de penetrar a membrana acrossomal intacta, corando em verde somente aqueles espermatozoides reagidos ou com acrossoma lesionado (CROSS et al., 1986) ao se ligar em moléculas de  $\alpha$ -manose dispostas na matriz acrossomal (CELEGHINI et al., 2007).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, foi seguido o protocolo proposto por Oliveira et al. (2012) modificado. Uma alíquota de 150  $\mu$ L de sêmen diluído em PBS<sup>6</sup> ( $5 \times 10^6$  spz/mL) foi incubada com 10  $\mu$ L de FITC-PSA<sup>7</sup> (100  $\mu$ g/mL; anexo A) e 3  $\mu$ L de IP<sup>8</sup> (0,5 mg/mL; anexo A) em microtubos plásticos (2 mL) dispostos em banho maria a 37 °C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu$ L de PBS e a amostra destinada à leitura no aparelho. Todas as amostras tiveram 10.000 células analisadas, numa taxa de aproximadamente 200 células/segundo, nos filtros A (FITC-PSA, lesão acrossomal) e C (IP, lesão de membrana plasmática) e excitação de 488 nm.

Foi possível a observação de quatro categorias celulares (figura 1), de acordo com as combinações de lesão de membrana plasmática e de acrossoma: (UL) IP+PSA-, espermatozoides com membrana plasmática lesionada; (UR) IP+PSA+, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionada; (LR) IP-PSA+, espermatozoides com acrossoma lesionado; e (LL) IP-PSA-, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras.

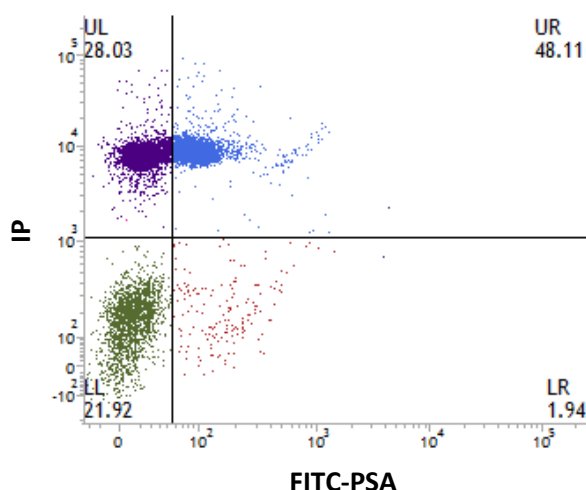


Figura 1: Gráfico de pontos (*dot-plots*) gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com PI e FITC-PSA, permitindo a classificação de espermatozoides em quatro categorias: LL, células viáveis; UL, células com membrana lesionada; UR, células com lesão de membrana e acrossoma; LR, células com acrossoma lesionado.

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

O potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) espermático foi avaliado mediante a utilização da sonda JC-1<sup>9</sup> (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 determinado de acordo com protocolo proposto por Ortega-Ferrusola et al. (2010) modificado. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra previamente diluída em meio PBS ( $5 \times 10^6$  sptz/mL) foi incubada com 0,5  $\mu\text{L}$  JC-1 (153  $\mu\text{M}$ ; anexo A) por 40 minutos em banho maria a 37 °C. Após esse período a amostra foi destinada à leitura no aparelho. 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.

Foi possível a classificação das células em três categorias: com alto, médio e baixo potencial mitocondrial. Para fins de análise estatística, foi considerado o somatório das células com potencial mitocondrial alto e médio (figura 2).

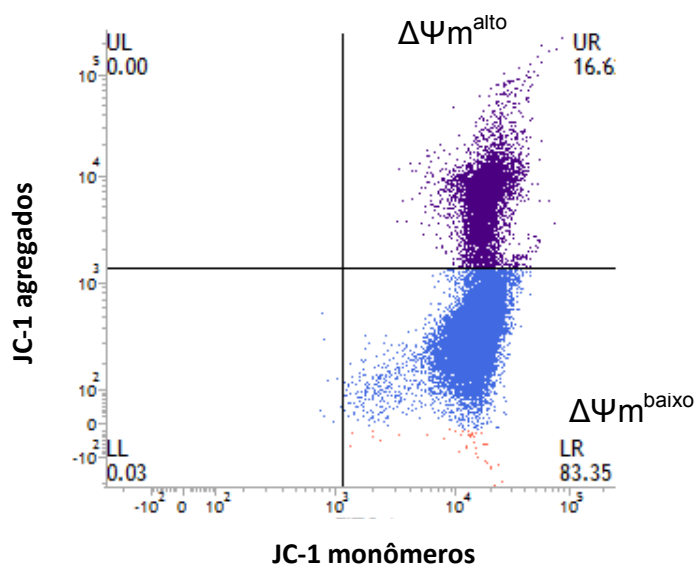


Figura 2: Gráfico de pontos (*dot-plots*) gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com JC-1, permitindo a classificação de espermatozoides com alto potencial mitocondrial (UR,  $\Delta\Psi_m^{\text{alto}}$ ) e baixo potencial mitocondrial (LR,  $\Delta\Psi_m^{\text{baixo}}$ ).

#### 2.4.2.3. Avaliação da peroxidação da membrana espermática (C11-BODIPY<sup>581/591</sup>/IP)

A avaliação da peroxidação da membrana espermática foi realizada mediante utilização do fluoróforo ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno-3-undecanoico (C11-BODIPY<sup>581/591</sup>), sonda que se incorpora prontamente em membranas biológicas (NEILD et al., 2005) e que responde ao ataque de radicais livres com uma reação irreversível que é quantificada pela citometria de fluxo como fluorescência verde (AITKEN et al., 2007).

Para análise da peroxidação das membranas, foi seguido o protocolo proposto por Oliveira et al. (2012). Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  do sêmen diluído em meio PBS ( $5 \times 10^6$  spz/mL) foi adicionada a um microtubo (2,0 mL) aquecido em banho maria a 37 °C e corada com 0,5  $\mu\text{L}$  da sonda C11-BODIPY<sup>581/591</sup> 10<sup>-10</sup> (1 mg/mL; anexo A) por 30 minutos a 37 °C. Após esse

período, uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  da amostra foi corada com 3  $\mu\text{L}$  de IP (0,5 mg/mL) como marcador das células com membrana plasmática lesada, permanecendo incubada por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de meio PBS e a amostra destinada à leitura no aparelho, onde foram analisadas 10.000 células, numa taxa de 400 células/segundo, com os filtros A (C11-BODIPY<sup>581/591</sup> peroxidado), B (C11-BODIPY<sup>581/591</sup> não peroxidado) e C (IP, células não viáveis) e excitação de 488 nm.

Foram observadas quatro categorias celulares, de acordo com as combinações de lesão de membrana plasmática e peroxidação de membrana (figura 3): (UL) IP+BODIPY-, espermatozoides mortos sem peroxidação da membrana plasmática; (UR) IP+BODIPY+, espermatozoides mortos com peroxidação da membrana plasmática; (LR) IP-BODIPY+, espermatozoides vivos com peroxidação da membrana plasmática; (LL) IP-BODIPY-, espermatozoides vivos sem peroxidação da membrana plasmática. Para análise estatística, também foram calculadas as populações de células peroxidadas e não peroxidadas, independente da viabilidade celular.

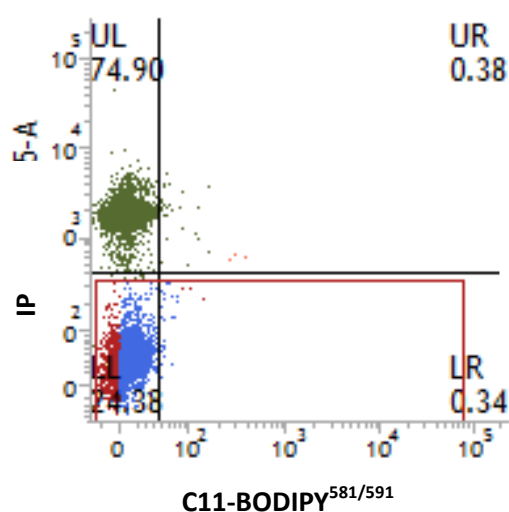


Figura 3: Gráfico de pontos (*dot-plots*) gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com PI e C11-BODIPY<sup>581/591</sup>, permitindo a classificação de espermatozoides em quatro categorias: LL, membrana íntegra sem peroxidação lipídica; UL, membrana lesionada sem peroxidação lipídica; UR, membrana lesionada com peroxidação lipídica; LR, membrana íntegra com peroxidação lipídica.

#### 2.4.2.4. Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular (DCFDA/IP)

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

Para avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular, foi seguido protocolo proposto por Macías-García et al. (2012a). Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  da amostra diluída em meio PBS ( $5 \times 10^6$  spz/mL) foi adicionada a um microtubo (2,0 mL) aquecido em banho maria a 37 °C, e corada com 0,5  $\mu\text{L}$  DCFDA<sup>11</sup> (1 mg/mL; anexo A) durante 30 minutos. Após esse período, 150  $\mu\text{L}$  da amostra incubada foi corada com 3  $\mu\text{L}$  de IP, permanecendo incubada por mais 5 minutos. Foram então adicionados 150  $\mu\text{L}$  de PBS e seguiu-se a leitura no aparelho. Foram contabilizadas 10.000 células, numa taxa de 400 células/segundo, com os filtros A (CFDA oxidado) e C (IP, células não viáveis) e excitação de 488 nm.

Foram observadas quatro populações celulares (figura 4a): (UL) IP+DCFDA-, espermatozoides mortos sem peróxido de hidrogênio intracelular; (UR) IP+DCFDA+, espermatozoides mortos com peróxido de hidrogênio intracelular; (LR) IP-DCFDA+, espermatozoides vivos com peróxido de hidrogênio intracelular; (LL) IP-DCFDA-, espermatozoides vivos sem peróxido de hidrogênio intracelular.

A fim de quantificar a concentração de peróxido de hidrogênio intracelular, foi realizada análise do histograma quanto à média de emissão do fluoróforo DCFDA pelas células viáveis captada no filtro A em relação a essa população (figura 4b).

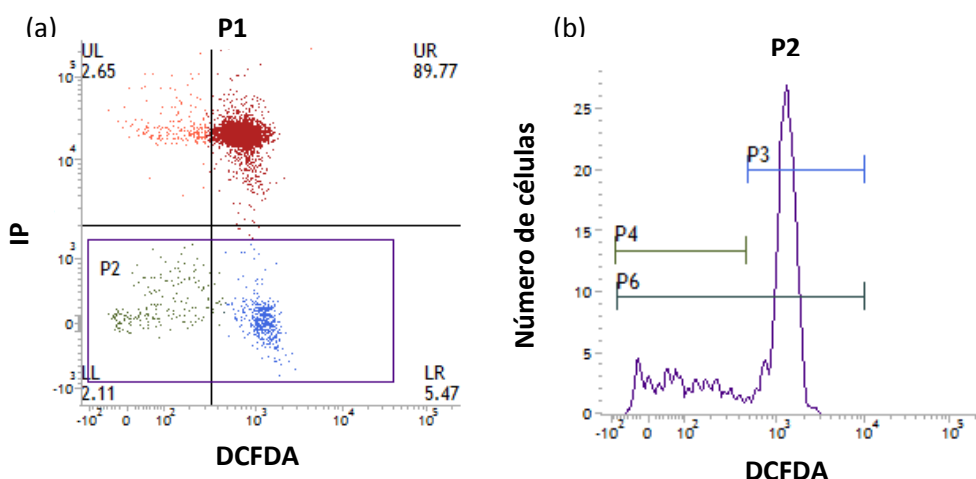


Figura 4: (a) Gráfico de pontos (*dot-plots*) gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com IP e DCFDA, permitindo a classificação de espermatozoides em quatro categorias: LL, células com membrana plasmática íntegra sem peróxido de hidrogênio intracelular; UL, células com membrana lesionada sem peróxido de hidrogênio intracelular; UR, células com membrana lesionada com peróxido de hidrogênio intracelular; LR, células com membrana íntegra com peróxido de hidrogênio intracelular. (b) Histograma da população de células viáveis (P2) analisada quanto à distribuição da fluorescência emitida pelo DCFDA: P3, células com peróxido de hidrogênio intracelular; P4, células sem peróxido de hidrogênio intracelular; P6, células viáveis.

#### 2.4.2.5. Avaliação da organização da bicamada lipídica (M540/6CFDA)

A organização da bicamada lipídica foi avaliada mediante a utilização das sondas merocianina (M540) e diacetato de 6-carboxifluorosceína (6CFDA). A M540 é uma sonda lipofílica (EASTON et al., 1978) com alta afinidade por membranas instáveis (PAYAN-CARREIRA et al., 2013), utilizada para detectar a desorganização fosfolipídica na camada externa da bicamada da membrana plasmática (LANGNER & HUI, 1993) e conseqüentemente o aumento da fluidez desta (PARTYKA et al., 2012). Já a 6CFDA é uma fluorosceína permeável à membrana celular, que é convertida por esterases intracelulares em composto impermeável, ficando retida em células com membrana plasmática íntegra (GILLAN et al., 2005) que passa a emitir fluorescência verde.

Para análise da estabilidade da membrana plasmática, uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  do sêmen diluído em meio PBS ( $5 \times 10^6$  spz/mL) foi adicionada a um microtubo (2,0 mL) aquecido em banho maria a 37 °C, e corada com 0,5  $\mu\text{L}$  M540<sup>12</sup> (0,5 mg/mL; anexo A) e 3  $\mu\text{L}$  de 6CFDA<sup>13</sup> (1  $\mu\text{g/mL}$ ; anexo A) durante

15 minutos. Após esse período foi adicionado 150 µL de PBS na amostra, que seguiu então para leitura no aparelho. Foram contabilizadas 10.000 células, numa taxa de 400 células/segundo, com os filtros A (6CFDA, células viáveis), B (M540, desorganização de membrana) e C (células não viáveis) e excitação de 488 nm.

Em todas as amostras, foi selecionada a população de células viáveis (figura 5a) e, a partir desta, quantificada a porcentagem de células com alta ou baixa desorganização de membrana (figura 5b).

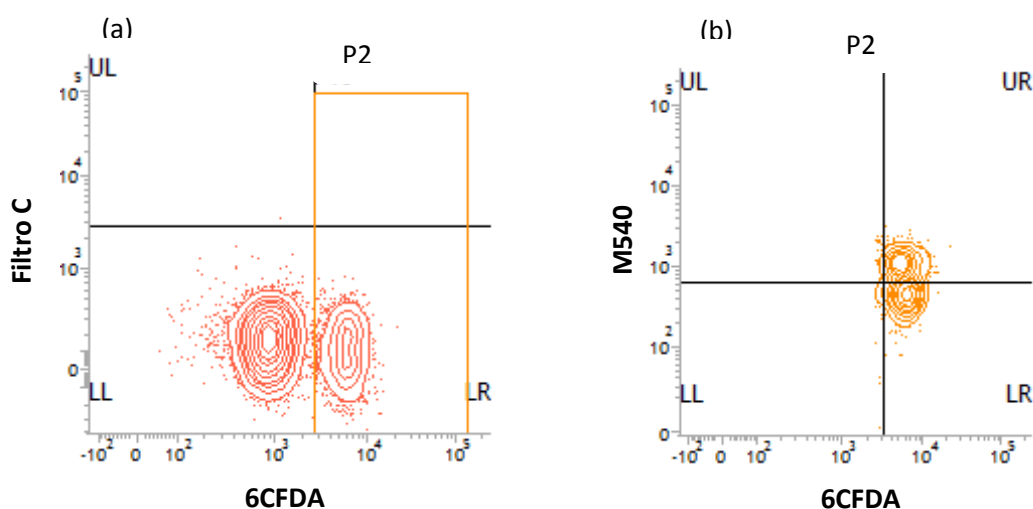


Figura 5: Gráfico de contorno (*contour plot*) gerado pela análise por citometria de fluxo em amostra corada com M450 e 6-CFDA. (a) Seleção da população de células viáveis (P2, 6CFDA+). (b) Populações de células viáveis com alta desorganização de membrana (UR – alta fluorescência para M450) e baixa desorganização de membrana (LR – baixa fluorescência para M450).

## 2.5. Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em ensaio fatorial 4x4 (04 tratamentos x 04 animais) seguindo o modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + A_j + T_i * A_j + e_{ijk} , \text{ onde:}$$

$Y_{ij}$ , resposta observada no  $i$ -ésimo tratamento e  $j$ -ésimo animal;  
 $\mu$ , constante geral;  
 $T_i$ , efeito do  $i$ -ésimo tratamento;  
 $A_j$ , efeito do  $j$ -ésimo animal;  
 $T_i * A_j$ , efeito de interação de tratamento e animal;  
 $e_{ijk}$ , erro aleatório.

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Bartlett) e foram avaliadas por Análise de Variância, a comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada pelo teste de Waller-Duncan. As variáveis qualitativas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Médias e erros-padrão da média foram avaliados por estatística descritiva. O nível de significância adotado foi  $\alpha = 0,05$ .

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O congelamento de sêmen de garanhões é frequentemente associado a resultados pouco satisfatórios em função da sua baixa fertilidade quando comparado ao sêmen fresco. Essa relação torna-se ainda mais prejudicada quando se considera o “efeito animal” no processamento. Algumas raças, e dentre elas a Mangalarga Marchador, é reconhecida por possuir indivíduos com amplas variações na resistência espermática frente à criopreservação (GOMES et al., 2002; ALVARENGA et al., 2005). Tal fato pode estar relacionado à composição do plasma seminal e ou determinadas características estruturais da membrana plasmática dos espermatozoides que possam favorecer ou não a sobrevivência destes nas condições impostas pela criopreservação.

No presente estudo, as características de todos ejaculados obtidos durante o período experimental apresentaram-se dentro dos padrões preconizados pelo CBRA (2013) para o congelamento de sêmen comercial (tabela 1). Embora não tenha sido observada interação entre animal e tratamento para todas as características avaliadas, todos os animais apresentaram resultados insatisfatórios no congelamento com glicerol (tabela

2). Em relação ao sêmen fresco, a utilização desse agente resultou em queda de 62,2 % (78,8 vs 29,8 %; tabela 2) da motilidade espermática total média, ressaltando a importância das pesquisas relacionadas à busca por crioprotetores alternativos para a espécie.

Tabela 1: Médias  $\pm$  erros padrão\* das características físicas de sêmen a fresco obtidos de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

Característica	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Média
Volume (mL)	30,7 $\pm$ 4,8	47,5 $\pm$ 6,2	45,0 $\pm$ 6,4	39,4 $\pm$ 5,4	41,0 $\pm$ 3,2
Motilidade total (%)	83,6 $\pm$ 1,8	82,2 $\pm$ 2,7	73,8 $\pm$ 4,7	70 $\pm$ 4,5	78,8 $\pm$ 1,9
Vigor (0-5)	3,8 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,1
Concentração ( $\times 10^6$ /mL)	203,6 $\pm$ 40,0	181,0 $\pm$ 17,9	196,6 $\pm$ 38,8	394,7 $\pm$ 58,6	230,6 $\pm$ 23,3

\*  $p > 0,05$ .

Tabela 2: Médias  $\pm$  erros padrão da motilidade total e vigor espermáticos pós-descongelamento de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador criopreservado em diferentes crioprotetores.

Tratamento	Motilidade (%)	Vigor (0-5)
GLIC	29,8 $\pm$ 3,8 <sup>C</sup>	2,6 $\pm$ 0,2 <sup>C</sup>
DMFA	53,1 $\pm$ 3,3 <sup>AB</sup>	3,1 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>
DG	57,4 $\pm$ 3,5 <sup>A</sup>	3,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
BC	45,9 $\pm$ 4,3 <sup>B</sup>	3,0 $\pm$ 0,1 <sup>bc</sup>

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

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

GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrió<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

No presente estudo, a avaliação rotineira de análise de sêmen foi associada à citometria de fluxo visando à comparação do efeito dos crioprotetores em relação aos prejuízos funcionais causados pela criopreservação. Na maioria das análises, os melhores resultados foram obtidos quando o congelamento ocorreu na presença de 5 % de dimetilformamida e/ou na sua associação (3 %) com glicerol (2 %). Esses resultados, entretanto, são mais evidentes ao comparar as médias obtidas de motilidade espermática registradas no tempo 0 e 30 minutos de incubação à 37 °C pós descongelamento (figura 6). Após esse período, as médias registradas

de todos os tratamentos revelaram motilidade abaixo de 30 %, indicando que o as amostras não foram resistentes ao teste. A queda na motilidade espermática após o descongelamento é associada à perda de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda dos espermatozoides, segundo Harrison & Vickers (1990). Além disso, a predominância de baixa atividade mitocondrial (tabela 3) parece estar relacionada a esses resultados, refletindo a taxa metabólica espermática após 40 minutos de incubação pós-descongelamento com a sonda JC-1, independente do tratamento.

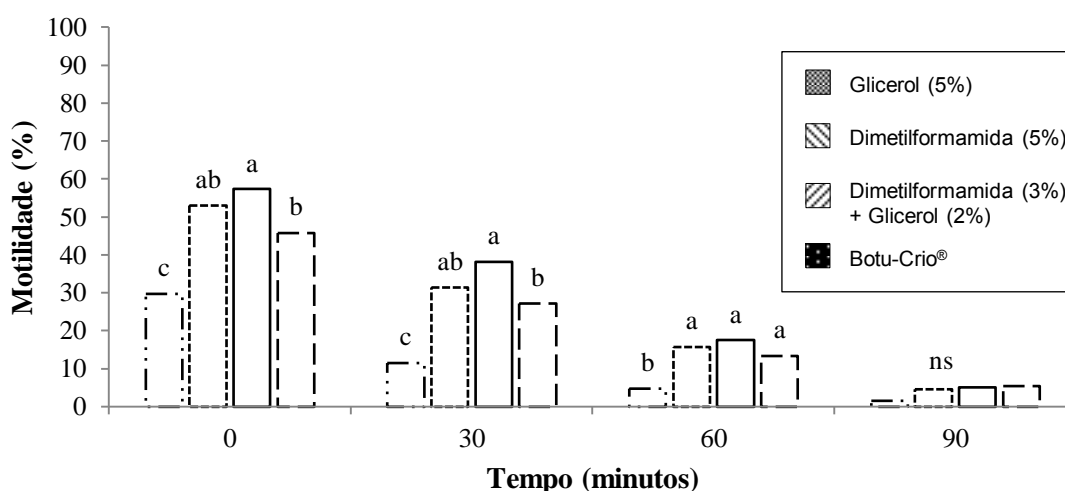


Figura 6. Médias da motilidade espermática total de amostras de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador congelado com diferentes crioprotetores e avaliadas pelo teste de termo resistência em intervalos de 30 minutos após descongelamento.

Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ); ns – não significativo ( $p > 0,05$ ).

Tabela 3. Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação ao potencial mitocondrial de espermatozoides criopreservados de equinos avaliadas por citometria de fluxo.

Tratamento	APM	BPM
GLIC	24,3 $\pm$ 4,2	75,6 $\pm$ 4,2
DMFA	24,7 $\pm$ 3,2	75,0 $\pm$ 3,2
DG	28,2 $\pm$ 4,1	71,5 $\pm$ 4,1
BC	27,2 $\pm$ 2,6	72,6 $\pm$ 2,6

$P > 0,05$ ; GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrio® (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida).

APM, alto potencial mitocondrial; BPM, baixo potencial mitocondrial.

Os prejuízos celulares causados pelo processo de criopreservação são decorrentes de alterações na temperatura e osmolaridade do meio, que provocam mudanças estruturais e morfológicas na organização e composição

dos lipídeos da membrana espermática e causam, como consequência, prejuízos na motilidade espermática e produção de ATP, além de maior susceptibilidade à lipoperoxidação e diminuição da capacidade fertilizante ou até mesmo morte celular (SIQUEIRA, 2004; CELEGHINI, 2005).

Considerando que não houve variação significativa entre as osmolaridades obtidas dos meios utilizados no presente estudo (de 1205 mOsm/Kg no tratamento DG a 1330 mOsm/Kg no tratamento BC), pode-se inferir que as diferenças quanto aos danos celulares observados entre os tratamentos não está associado à essa condição, mas sim às diferentes propriedades de cada crioprotetor utilizado. A hiperosmolaridade parece ter afetado de sobremaneira o potencial mitocondrial, que se manteve baixo em todos os tratamentos (71,5 a 75,6 %; tabela 3). O mesmo foi observado por Macías García et al. (2012a) ao avaliarem o efeito da osmolaridade sobre diversos parâmetros fisiológicos de espermatozoides refrigerados e recuperados por meio de coloide em camada única (bpm = 83,0 a 85,7 %). Isso se deve à alta sensibilidade mitocondrial ao choque osmótico, conforme demonstrado em espermatozoides de macacos Rhesus e garanhões (Pommer et al., 2002; Rutllant et al., 2003; Correa et al., 2007; Macias et al., 2011).

A menor porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras observada no tratamento à base de glicerol a 5 % (15,8 %; tabela 4) pode estar relacionada à menor permeabilidade desse agente em relação aos demais crioprotetores utilizados. Segundo Macías García et al. (2012b), o glicerol apresenta efeitos tóxicos para espermatozoides equinos quando presente em concentrações superiores a 3,5 %, especialmente em relação a danos na membrana plasmática. O glicerol, por permear a membrana espermática mais lentamente que a dimetilformamida (GLAZAR et al., 2009), oferece menor efeito crioprotetor e conseqüentemente maior dano osmótico à célula, conferindo maiores prejuízos à viabilidade celular. Além disso, o glicerol, quando comparado às amidas, provoca piores danos ao acrossoma (MOCÉ et al., 2010).

Tabela 4. Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal avaliadas em espermatozoides criopreservados de equinos por citometria de fluxo.

Tratamento	IP+PSA-	IP+PSA+	IP-PSA+	IP-PSA-
GLIC	47,6 $\pm$ 2,6 <sup>A</sup>	33,1 $\pm$ 3,7 <sup>A</sup>	3,5 $\pm$ 1,6 <sup>A</sup>	15,8 $\pm$ 3,1 <sup>B</sup>
DMFA	40,4 $\pm$ 3,0 <sup>A</sup>	19,5 $\pm$ 2,5 <sup>B</sup>	12,7 $\pm$ 2,7 <sup>A</sup>	27,5 $\pm$ 3,6 <sup>A</sup>
DG	43,2 $\pm$ 2,2 <sup>A</sup>	25,6 $\pm$ 4,6 <sup>AB</sup>	11,6 $\pm$ 3,8 <sup>A</sup>	19,6 $\pm$ 2,9 <sup>AB</sup>
BC	46,6 $\pm$ 2,3 <sup>A</sup>	20,2 $\pm$ 2,1 <sup>B</sup>	6,3 $\pm$ 1,2 <sup>A</sup>	26,9 $\pm$ 3,3 <sup>A</sup>

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

GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

IP+PSA-, espermatozoides com membrana plasmática lesionada; IP+PSA+, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionada; IP-PSA+, espermatozoides com acrossoma lesionado; e IP-PSA-, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras

Os prejuízos causados à membrana plasmática frente ao processo de criopreservação resultam em morte celular de grande parte dos espermatozoides (HOLT, 2000) ou, nos espermatozoides sobreviventes, provocam alterações semelhantes àquelas observadas durante a capacitação, reduzindo sua vida útil (PÉREZ et al., 1996; CORMIER et al., 1997; WATSON, 2000). Os crioprotetores são reconhecidos por induzirem a reação acrossomal e o processo congelamento/descongelamento pode induzir à ruptura precoce do acrossoma (CENTOLA et al., 2005). Diante disso, as alterações em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal observadas no tratamento GLIC pode estar relacionado à reação acrossomal precoce, uma vez que esse tratamento resultou também em maior desorganização da bicamada lipídica diante da avaliação com a M540 (56,7 % dentre as células viáveis; tabela 5).

Tabela 5. Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à desorganização da bicamada lipídica avaliadas em espermatozoides criopreservados de equinos por citometria de fluxo.

Tratamento	6CFDA-	6CFDA+		
		M540-	M540+	M540+ (%V)
GLIC	74,4 $\pm$ 3,0 <sup>B</sup>	11,4 $\pm$ 2,6 <sup>B</sup>	14,2 $\pm$ 2,6 <sup>A</sup>	56,7 $\pm$ 6,6 <sup>A</sup>
DMFA	72,1 $\pm$ 1,6 <sup>B</sup>	16,4 $\pm$ 2,1 <sup>A</sup>	11,4 $\pm$ 2,1 <sup>A</sup>	41,7 $\pm$ 7,2 <sup>AB</sup>
DG	80,6 $\pm$ 2,2 <sup>A</sup>	13,8 $\pm$ 0,7 <sup>AB</sup>	5,6 $\pm$ 0,7 <sup>B</sup>	35,0 $\pm$ 5,9 <sup>B</sup>
BC	82,7 $\pm$ 1,8 <sup>A</sup>	13,2 $\pm$ 0,6 <sup>B</sup>	4,1 $\pm$ 0,6 <sup>B</sup>	28,0 $\pm$ 4,1 <sup>B</sup>

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

GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida).

6CFDA-, células mortas; 6CFDA+, células viáveis; M540-, bicamada lipídica organizada; M540+, bicamada lipídica desorganizada; M540+ (%), porcentagem de células com a bicamada lipídica desorganizada em relação à população de células viáveis.

Segundo Harrison et al. (1996) e Gadella & Harrison (2002), a desorganização da bicamada evidenciada pela M540 é indicativa de desestabilização da membrana, semelhante à que ocorre durante as primeiras etapas da capacitação, uma vez que a desordem de fosfolipídeos detectada pela M540 é induzida pelo aumento de bicarbonato intracelular, que ocorre no início desse processo (HALLAP et al., 2006). Como a capacitação espermática desestabiliza a membrana plasmática, pode-se supor que quando ela ocorre precocemente, leva à ruptura acrossomal e / ou morte celular (CORMIER et al., 1997; JANUSKAUSKAS et al., 2000). A alta correlação negativa obtida no presente estudo entre desorganização de membrana e integridade de membrana plasmática e acrossomal ( $r = -0,65$ ;  $p < 0,001$ ) e positiva com lesão nesses compartimentos ( $r = 0,51$ ;  $p < 0,01$ ) aliada à alta proporção de peróxido de hidrogênio intracelular por célula viável observada no tratamento GLIC (195,9; tabela 6) são indícios de que esse tratamento tenha resultado em capacitação espermática e reação acrossomal precoces.

Tabela 6. Médias  $\pm$  erros padrão da intensidade de peróxido de hidrogênio intracelular na população total de células viáveis (unidades arbitrárias) e sua proporção em relação à viabilidade celular de sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador, avaliadas por citometria de fluxo

Tratamento	MEFt	MEFt/v
GLIC	3081 $\pm$ 180,2 <sup>A</sup>	195,9 $\pm$ 29,6 <sup>A</sup>
DMFA	2539,5 $\pm$ 190,4 <sup>A</sup>	102,3 $\pm$ 21,2 <sup>B</sup>
DG	2484,2 $\pm$ 198,1 <sup>A</sup>	91,8 $\pm$ 11,5 <sup>B</sup>
BC	2665,4 $\pm$ 165,3 <sup>A</sup>	120,9 $\pm$ 12,9 <sup>B</sup>

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna diferem entre si pelo teste de Waller Duncan ( $p < 0,05$ ). GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCriio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

MEFt, média de emissão do fluoróforo DCFDA pelas células viáveis; MEFt/v, relação entre a média de emissão do fluoróforo DCFDA pelas células viáveis/população de células viáveis

A produção de ROS, e dentre elas o peróxido de hidrogênio, é fisiologicamente necessária para o processo de fertilização, estando diretamente relacionada à capacitação espermática (GRIVEAU & LE, 1997; BAUMBER et al., 2003 a,b). O aumento nas concentrações de ROS acarreta em fosforilação de resíduos de tirosina em espermatozoides de diversas espécies (BAUMBER et al., 2003b; ROY & ATREJA, 2008; KOTA et al., 2010; DONA et al., 2011) e parece ser necessário para a ocorrência do efluxo de

colesterol da membrana espermática (BOERKE et al., 2013). Segundo Aurich (2005) e Lamirande & O'Flahert (2008), a capacitação pode ser induzida por baixas concentrações de ROS, enquanto que a peroxidação excessiva danifica a membrana plasmática e acrossomal, resultando em perda de motilidade, depleção de ATP e redução da fertilidade.

Já o aumento relativo na proporção de membrana desorganizada na população de células viáveis observado no tratamento DMFA (41,7 %; tabela 5) pode estar relacionado à quantidade de células viáveis com peróxido de hidrogênio intracelular observada nesse tratamento (23,3 %; tabela 7). A relação entre a desorganização de membrana observada no tratamento DMFA e a presença de peróxido de hidrogênio intracelular corroboram com estudo de Macías García et al. (2015) que, ao incubarem espermatozoides equinos em meio contendo bicarbonato, relataram aumento na produção de ROS e fosforilação de resíduos de tirosina, porém sem ocorrência de capacitação espermática que foi evidenciada pela ausência de efluxo do colesterol da membrana plasmática. Esse fato, associado à relativa baixa proporção de peróxido de hidrogênio intracelular nas células viáveis (102,3; tabela 6) e aos resultados referentes à integridade de membrana plasmática e acrossomal observada nesse tratamento (27,5 %; tabela 4), permite inferir que a desordem de fosfolipídeos detectada pela M540 no tratamento DMFA não foi relacionada à capacitação espermática e reação acrossomal. Possivelmente, essas células encontravam-se no início do processo, uma vez que a marcação pela M540 é indicativa dos primeiros eventos relacionados à capacitação (RATHI et al., 2001), embora tais alterações possam ser apenas decorrentes de uma desestabilização de membrana (GREEN & WATSON, 2001).

Tabela 7. Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção de peróxido de hidrogênio, de sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador, avaliadas por citometria de fluxo

Tratamento	IP+DCFDA-	IP+DCFDA+	IP-DCFDA+	IP-DCFDA-
GLIC	13,5 $\pm$ 3,1 <sup>A</sup>	65,3 $\pm$ 4,5 <sup>A</sup>	15,3 $\pm$ 2,3 <sup>B</sup>	5,9 $\pm$ 1,9 <sup>3A</sup>
DMFA	15,9 $\pm$ 3,8 <sup>A</sup>	49,9 $\pm$ 5,0 <sup>A</sup>	23,3 $\pm$ 2,1 <sup>A</sup>	10,9 $\pm$ 2,4 <sup>A</sup>
DG	10,6 $\pm$ 2,2 <sup>A</sup>	58,6 $\pm$ 3,6 <sup>A</sup>	18,5 $\pm$ 2,0 <sup>AB</sup>	12,3 $\pm$ 2,4 <sup>A</sup>
BC	13,6 $\pm$ 2,3 <sup>A</sup>	61,2 $\pm$ 3,7 <sup>A</sup>	18,3 $\pm$ 1,8 <sup>AB</sup>	6,9 $\pm$ 1,1 <sup>A</sup>

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

GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

IP+DCFDA-, espermatozoides mortos sem peróxido de hidrogênio intracelular; IP+DCFDA+, espermatozoides mortos com peróxido de hidrogênio intracelular; IP-DCFDA+, espermatozoides vivos com peróxido de hidrogênio intracelular; IP-DCFDA-, espermatozoides vivos sem peróxido de hidrogênio intracelular.

Por outro lado, a presença de glicerol a baixas concentrações como as utilizadas nos tratamentos BC e DG pode ter influenciado na menor proporção de células viáveis com membrana plasmática organizada (28,0 e 35,0 % das células viáveis, respectivamente; tabela 5), contrapondo seus efeitos tóxicos. Segundo Amman & Pickett (1987) e Yldiz et al. (2007) o glicerol apresenta maior ação extracelular, atuando de forma a estabilizar a membrana, reduzindo os danos causados pela criopreservação. De acordo com Boggs & Rangaraj (1985), o glicerol leva à interdigitação das moléculas de fosfatidilcolina da bicamada lipídica, alterando a fluidez da membrana por aumentar a organização das cadeias de ácidos graxos.

Em relação à produção de peróxido de hidrogênio observada nos demais tratamentos, a menor porcentagem de células viáveis com alta produção desse metabólito nas amostras referentes ao tratamento GLI (15,3 %; tabela 7), pode estar relacionado à menor taxa metabólica desses espermatozoides e consequentemente menor capacidade de produção de ROS. Essa relação metabolismo *versus* geração endógena de ROS corrobora estudos que comparam animais “bons congeladores” e “maus congeladores” (YESTE et al., 2014) ou que utilizam de métodos de seleção espermática como o Androcoll-E<sup>®</sup> (MACÍAS-GARCÍA et al., 2012a), onde fica evidente a maior produção de ROS nas amostras com melhores motilidades pós-descongelamento. Além disso, o glicerol tem como propriedade a eliminação de radicais hidroxila (ASHWOOD-SMITH, 1975). Essa característica pode estar relacionada à menor porcentagem relativa de células viáveis com alta produção de peróxido de

hidrogênio observada nos tratamentos DG e BC (18,5 e 18,3 %, respectivamente; tabela 7), refletindo possivelmente em maior resistência frente ao estresse oxidativo proporcionado pela criopreservação.

Provavelmente, a maior proporção de células viáveis com peróxido de hidrogênio observada no tratamento DMFA (23,3 %; tabela 7) e a maior produção de peróxido de hidrogênio intracelular por célula viável observada no tratamento GLIC (195,9 ; tabela 6) não foram suficientes para resultar em peroxidação da bicamada lipídica, uma vez que os resultados referentes à utilização da sonda C11-BODIPY<sup>581/591</sup> não diferiram entre os tratamentos (tabela 8). Além disso, os valores médios obtidos em relação à peroxidação lipídica (0,1 a 1,0 %; tabela 9) apresentaram-se semelhantes aos obtidos por Ortega Ferrusola et al. (2009) ao avaliarem sêmen fresco de garanhões (0,2 a 1,9 %), sugerindo que o estresse oxidativo inerente à criopreservação, no presente estudo, não foi suficiente para causar prejuízos celulares relacionados à lipoperoxidação.

Tabela 8. Médias ± erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à viabilidade e peroxidação da bicamada lipídica, de sêmen criopreservados de garanhões da raça Mangalarga Marchados, avaliadas por citometria de fluxo.

Tratamento	IP+BODIPY-	IP+BODIPY+	IP-BODIPY+	IP-BODIPY-
GLIC	78,5±3,1	0,03±0,01	0,1±0,1	21,4±3,1
DMFA	63,7±4,1	0,7±0,5	0,3±0,2	35,3±4,0
DG	65,5±3,2	0,03±0,02	0,1±0,02	34,4±3,2
BC	68,7±4,8	0,03±0,01	0,04±0,01	31,2±4,8

P>0,05; GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)  
 IP+BODIPY-, espermatozoides mortos sem lipoperoxidação; IP+BODIPY+, espermatozoides mortos com lipoperoxidação; IP-BODIPY+, espermatozoides vivos com lipoperoxidação; IP-BODIPY-, espermatozoides vivos sem lipoperoxidação.

Tabela 9. Médias ± erros padrão da porcentagem de peroxidação da bicamada lipídica sofrida pelos espermatozoides, mediante avaliação por citometria de fluxo

Tratamento	Peroxidação	Não Peroxidação
GLIC	0,1±0,1	99,9±0,1
DMFA	1,0±0,7	99,0±0,7
DG	0,1±0,03	99,9±0,03
BC	0,1±0,01	99,9±0,01

P>0,05; GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

Embora o ideal seja estabelecer um único ensaio que apresente correlação com a fertilidade a campo, a quantidade de atribuições que o espermatozoide deve apresentar para garantir sucesso na fertilização torna esse objetivo pouco provável de ser alcançado. Com isso, maior número de ensaios permite melhor previsão de fertilidade espermática (KIRK et al., 2005) e esta é a razão do grande número de variáveis avaliadas no presente estudo. As diversas sondas disponíveis para análise de viabilidade espermática, capacitação, status acrossomal, estabilidade de cromatina e potencial mitocondrial, aliadas à eficiência da técnica de citometria de fluxo, surgem como alternativa promissora para avaliar os aspectos mais significativos da capacidade de fertilização de determinada amostra e, conseqüentemente, a elaboração de diluentes que danifiquem minimamente os espermatozoides.

#### **4. CONCLUSÃO**

O uso da dimetilformamida a 5 % ou a sua combinação a 3 % com o glicerol a 2 % melhora as características *in vitro* do sêmen criopreservados de garanhões, sendo mais eficaz na crioproteção das células espermáticas dessa espécie em relação ao uso do glicerol como agente crioprotetor único.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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.

ARIFIANTINI, R. I.; PURWANTARA, B.; YUSUF, T. L.; SAJUTHI, D. Effect of different cryoprotective agents on skim milk and dimitropoulos extender for stallion semen cryopreservation. **Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture**, v. 35, p. 68-74. 2010.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Current concepts concerning radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 243, p. 246-256. 1975.

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

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

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

BOERKE, A.; BROUWERS, J. F.; OLKKONEN, V. M.; VAN DE LEST, C. H.; SOSTARIC, E.; SCHOEVERS, E. J.; HELMS, J. B.; GADELLA, B. M. Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 88, p. 1-18. 2013.

BOGGS, J. M.; RANGARAJ, G. Phase transitions and fatty acid spin label behavior in interdigitated lipid phases induced by glycerol and polymyxin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 816, p. 221-233. 1985.

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.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2005.

CENTOLA, G. M.; MATTOX, J. H.; BURDE, S.; LEARY, J. F. Assessment of the viability and acrosome status of fresh and frozen-thawed human spermatozoa using single-wavelength fluorescence microscope. **Molecular Reproduction and Development**, v. 27, p. 130-135. 2005.

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.

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

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

CORREA, L. M.; THOMAS, A.; MEYERS, S. A. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 942-953. 2007.

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

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

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.

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

FAHY, G. M. Cryoprotectant toxicity neutralization. **Cryobiology**, v. 60, p. 45-53. 2010.

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

FAHY, G. M.; LILLEY, T. H.; LINSDELL, H.; DOUGLAS, M. S. J.; MERYMAN, H. T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v. 27, p. 247-268. 1990.

FAHY, G. M.; LEVY, D. I.; ALI, S. E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. **Cryobiology**, v. 24, p. 196-213. 1987.

FRACZEK, M.; PIASECKA, M.; GACZARZEWICZ, D.; SZUMALA-KAKOL, A.; KAZIENKO, A.; LENART, S.; LASZCZYNSKA, M.; KURPISZ, M. Membrane stability and mitochondrial activity of human ejaculated spermatozoa during in vitro experimental infection with *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Bacteroides ureolyticus*. **Andrologia**, v. 44, p. 315–329. 2012.

FÜRST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino**. 2006. 96p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2006.

GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. Capacitation induces cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 340-350. 2002.

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

GILLAN, I.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential **Theriogenology**, v. 63, p. 445–457. 2005.

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

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

GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247. 2001.

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.

GRIVEAU, J. F.; LE, L. D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, p. 61-69. 1997.

HALLAP, T.; NAGY, S.; JAAKMA, U.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Usefulness of a triple fluorochrome combination Merocyanine 540/Yo-Pro 1/Hoechst 33342 in assessing membrane stability of viable frozen-thawed spermatozoa from Estonian Holstein AI bulls. **Theriogenology**, v. 65, p. 1122-1136. 2006.

HARRISON, R. A.; ASHWORTH, P. J.; MILLER, N. G. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 378-391. 1996.

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

HENRY, M.; SNOECK, P. P. N.; COTTORIELLO, A. C. P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants, **Theriogenology**, v. 58, p. 245-248. 2002.

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

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

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

KOTA, V.; RAI, P.; WEITZEL, J. M.; MIDDENDORFF, R.; BHANDE, S. S.; SHIVAJI, S. Role of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 in mouse sperm

capacitation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, p. 773-783. 2010.

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

LANGNER, M.; HUI, S. W. Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1149, p. 175-179. 1993.

LEIBO, S. P.; PICTON, H. M.; GOSDEN, R. G. Cryopreservation of human spermatozoa. In: VAYENA, E.; ROWE, P. J.; GRIFFIN, P. D. (Ed.). **Current practices and controversies in assisted reproduction**. Geneva: World Health Organization, p. 152-165. 2002.

LOOMIS, P. R.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTAlactose-egg yolk and packaged in straws. **Journal of Animal Science**, v. 56, p. 687-693. 1983.

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

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

MACÍAS-GARCÍA, B.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; LOUX, S. C.; ROCHA, A. M.; GUIMARÃES, T.; PEÑA, F. J.; VARNER, D. D.; HINRICH, K. Effect of calcium, bicarbonate, and albumin on capacitation-related events in equine sperm. **Reproduction**, v. 149, p. 87-99. 2015.

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

MACÍAS GARCÍA, B.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; APARICIO, I. M.; MIRÓ MORÁN, 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.

MACIAS, G. B.; MIRO, M. A.; GONZALEZ, F. L.; ORTEGA, F. C.; MORILLO, R. A.; GALLARDO BOLANOS, J. M.; BALAO DA SILVA, C. M.; RODRIGUEZ, M. H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic induced stress: role of c-Jun

Nterminal kinase (JNKs) pathway. **Journal of Andrology**, v. 33, p. 105-113. 2011.

MARTÍNEZ-PASTOR, F.; MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; ANEL, L; PAZ, P. Probes and Techniques for Sperm Evaluation by Flow Cytometry. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, Suppl. 2, p. 67-78. 2010.

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.

MEDEIROS, A. S. L. **Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade do sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores**. 2007. 94p. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2007.

MEDEIROS, A. S. L. **Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões**. 2003. 123p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2003.

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

MESA, A.; HENAO, G. Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros postdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. **Revista MVZ Córdoba**, v. 17, p. 2908-2915. 2012.

MOCÉ, E.; GRASSEAU, I.; BLESBOIS, E. Cryoprotectant and freezing processes alter the ability of chicken sperm to acrosome react. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 359-366. 2010.

MOFFET, P. D.; BRUEMMER, J. E.; CARD, C.; SQUIRES, E. L. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. In ANNUAL CONFERENCE OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 2003, Columbus, **Proceedings...** 2003, p.42.

MORILLO RODRIGUEZ, A.; BALAO DA SILVA, C.; MACÍAS-GARCÍA, B.; GALLARDO BOLAÑOS, J. M.; TAPIA, J. A.; APARICIO, I. M.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; PEÑA, F. J. Dimethylformamide improves the in vitro characteristics of thawed stallion spermatozoa reducing sublethal damage. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 995-1002. 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of horse**. 6<sup>th</sup> ed. Washington, DC: National Academy Press, 2007. 360 p.

NEILD, D. M.; BROUWERS, J. F.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B. M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of

fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, p. 230-238. 2005.

OHASHI, O. M. Inseminação Artificial em Bubalinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Eds). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001, p.97-110.

OLIVEIRA, R. A.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. Índice de prenhez com sêmen congelado de garanhões da raça Crioula usando glicerol ou dimetilformamida como crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, p. 488-494. 2013.

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.

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74 , p. 458–465. 2010.

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MORRELL, J. M.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, p. 55-63. 2009.

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

PARTYKA, A.; NIŻAŃSKI, W.; OCHOTA, M. Methods of Assessment of Cryopreserved Semen. In: KATKOV, I. (Ed.). **Current Frontiers in Cryobiology**, Rijeka, Croácia, 2012. p. 547-574.

PAYAN-CARREIRA, R.; BORGES, P.; MIR, F.; FONTBONNE, A. Molecular Markers in Sperm Analysis. In: LEMMA, A. (Ed.). **Success in Artificial Insemination – Quality of Semen and Diagnostics Employed**. Rijeka, Croácia, 2013. p. 93-115.

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

PÉREZ, L. J.; VALCÁRCEL, A.; HERAS, M. A.; MOSES, D.; BALDASARRE, H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by Chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v. 46, p. 131-140. 1996.

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

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

ROY, S. C.; ATREJA, S. K. Effect of reactive oxygen species on capacitation and associated protein tyrosine phosphorylation in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 68-84. 2008.

RUTLLANT, J.; POMMER, A. C.; MEYERS, S. A. Osmotic tolerance limits and properties of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, p. 534-541. 2003.

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

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

SILVA, L.D.M.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S. Inseminação Artificial em Cães. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. p. 69-96.

SIQUEIRA, J. B. **Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática "in vitro"**. 2004. 77p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 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.

VIDAMENT, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 115–36. 2005.

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

VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTRON, S.; LE TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 201-218. 2001.

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

VIDAMENT, M.; DUPERE, A. M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: Freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, p. 907-917. 1997.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-92. 2000.

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

YILDIZ, C.; OTTAVIANI, P.; LAW, N.; AYEARST, R.; LIU, L.; MCKERLIE, C. Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. **Reproduction**, v. 133, p. 585-595. 2007.

# ASSOCIAÇÃO DE DIFERENTES ADITIVOS E CRIOPROTETORES NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES

## 1. INTRODUÇÃO

Embora muitos anos tenham se passado desde que o glicerol foi descoberto como crioprotetor celular (POLGE, et al. 1949), os protocolos de congelamento de sêmen continuam resultando em baixa sobrevivência espermática para muitas espécies. Numerosos estudos têm sido conduzidos ao longo dos últimos anos com o objetivo de aumentar a quantidade e qualidade de espermatozoides recuperados pós-descongelamento e, apesar dos avanços obtidos, a maior parte dos benefícios observados *in vitro* não resultaram em aumento da capacidade de fertilização *in vivo* (MOCÉ et al., 2010).

A criopreservação seminal, especialmente para a espécie equina, é reconhecidamente deletéria às funções espermáticas por reduzir significativamente as taxas de concepção pós-inseminação quando comparada ao sêmen fresco ou resfriado (SIEME et al., 2003a). Tal fato é associado às lesões ocorridas na membrana espermática em função da desidratação celular e formação de cristais de gelo (PARKS & GRAHAM, 1992).

À medida que a temperatura diminui durante o resfriamento (19 a 5 °C), a membrana espermática passa por uma série de alterações que inclui a mudança de fase, do estado fluido para o estado gel (GRAHAM, 1996), onde as cadeias de ácidos graxos que se encontravam distribuídas de forma aleatória passam a ordenar-se paralelamente, resultando na formação de estrutura rígida com áreas susceptíveis a rupturas e fusões, além do aumento na sua permeabilidade (AMMAN & PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990; WATSON, 1995). Essa fase de transição acarreta em desestabilização da membrana (AMMAN & PICKETT, 1987) e extravasamento de conteúdo intracelular (DROBNIS et al., 1993). Associado a esses fenômenos, a hiperosmolaridade inerente aos meios diluidores utilizados na criopreservação resultam em aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (ROS;

BURNAUGH et al., 2010). A consequência direta desses eventos é a diminuição da viabilidade ou até mesmo morte celular.

O estresse osmótico ocasionado no processo de congelamento e descongelamento está relacionado à fluidez e permeabilidade da membrana celular tanto em relação à água quanto ao crioprotetor (LI et al., 2006), daí a importância da composição do diluidor para a sobrevivência espermática (HAMMERSTEDT et al., 1990; SIEME et al., 2003b). O crioprotetor é considerado ideal quando, ao penetrar a membrana plasmática, não provoca desidratação ou lesão celular, e, ao mesmo tempo, não seja tóxico nas concentrações necessárias para evitar esses eventos (FAHY, 1986; FAHY et al., 1987), devendo ainda apresentar menor peso molecular, maior solubilidade em água e toxicidade mínima (ÁLVAREZ et al., 2014).

A sensibilidade de espermatozoides de ganhões ao processo de criopreservação é associada à composição dos lipídeos da membrana plasmática, principalmente em relação à proporção colesterol:fosfolípido, a qual influencia diretamente a sua fluidez e estabilidade (GRAHAM & FOOTE, 1987). Espermatozoides com alta relação colesterol:fosfolípido, como de humanos e coelhos, são mais resistentes ao choque térmico e sofrem menos prejuízos à membrana plasmática durante o congelamento (DARIN-BENNETT & WHITE, 1977). Além da baixa relação colesterol:fosfolípido, estudos demonstram que a criopreservação leva à redução do conteúdo de colesterol da membrana plasmática (CEROLINI et al., 2001; MOORE et al., 2005; SRIVASTAVA et al., 2013), ocasionando o fenômeno denominado criocapacitação, que reduz a viabilidade espermática pós-descongelamento (BAILEY et al., 2000).

Visando melhorar a condição do espermatozoide no pré-congelamento, diversos estudos têm sido conduzidos com o intuito de incrementar o conteúdo de colesterol nas membranas espermáticas. A incubação de espermatozoides com colesterol carregado por ciclodextrinas (CCC) antes da criopreservação proporciona aumento na motilidade total e progressiva (MADISON et al., 2013; HARTWIG et al., 2014), viabilidade espermática (PAMORNSAKDA et al., 2011; MURPHY et al., 2014), redução de lesões na membrana plasmática (MOORE et al., 2005) e acrossomal (OLIVEIRA et al., 2010) e da produção de ROS (MURPHY et al., 2014).

Tais benefícios são relacionados a modificações na fluidez e permeabilidade da membrana plasmática à água (MÜLLER et al., 2008) e aos crioprotetores (LI et al., 2006; GLAZAR et al., 2009), o que promove aumento na tolerância ao choque osmótico (AKSOY et al., 2010). Embora Glazar et al. (2009) tenham relatado aumento na permeabilidade da membrana de espermatozoides tratados com CCC e diferentes crioprotetores, os efeitos funcionais dessas associações tem sido pouco estudado.

A modificação à tolerância ao choque osmótico e térmico provocado por alterações na relação colesterol:fosfolípídeo da membrana plasmática afeta diretamente a produção de ROS (MEGLI et al., 2011). Murphy et al. (2014) observaram redução na produção de superóxido por espermatozoides equinos tratados com CCC antes da criopreservação. Porém, foi demonstrado que a CCC não foi eficiente em prevenir a peroxidação fosfolipídica de membrana de espermatozoides de camundongos, possivelmente em função do aumento na produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial (GRAY et al., 2013). Tal fato pode ter como consequência a perda de integridade de membrana e funcionalidade celular, o que resulta em redução da motilidade (ÁLVAREZ et al., 1987; GRIVEAU et al., 1995). Além disso, a peroxidação lipídica está envolvida na capacitação espermática (LAMIRANDE et al., 1993) que, quando ocorrida prematuramente, resulta em diminuição da fertilidade (MCNIVEN & RICHARDSON et al., 2003).

Visando reduzir a ocorrência da peroxidação lipídica decorrente da criopreservação, diversos estudos abordam a ação de antioxidantes sobre a função espermática, porém, com resultados contraditórios, em virtude de divergências na susceptibilidade à peroxidação lipídica, no tipo e na concentração do antioxidante utilizado, assim como no seu mecanismo de ação específico referente à proteção de célula espermática (GUTHRIE & WELCH, 2012). A abordagem acerca da antocianina, um composto fenólico com atividade antioxidante reconhecida (PRIOR, 2003), na criopreservação do sêmen equino é, contudo, inédita.

Assim sendo, objetivou-se no presente estudo avaliar o efeito do congelamento de espermatozoides de garanhões em meio contendo glicerol e ou dimetilformamida, associados à antocianina e ou CCC.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Delineamento Experimental

No presente estudo, foram utilizados oito garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 4 e 15 anos, provenientes do Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, do Haras JA e Haras Recreio, ambos situados no município de Viçosa, Minas Gerais (latitude 20° 45' 20" Sul, longitude 42° 52' 53" Oeste, altitude média de 752 m). Todos os animais foram previamente submetidos ao exame andrológico e considerados aptos à reprodução, de acordo com os padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013) para a espécie equina. De cada reprodutor foram obtidos no mínimo cinco ejaculados, o que resultou em quarenta e oito partidas congeladas para os testes de viabilidade espermática *in vitro*. As colheitas foram realizadas no período de julho a agosto de 2013. Todos os procedimentos envolvendo os animais foram realizados seguindo as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Durante o período experimental, os animais permaneceram alojados em baias de alvenaria de 16 m<sup>2</sup> com cama de capim gordura, sendo soltos diariamente e individualmente, em piquetes de capim *coast cross* e tifton (*Cynodon* spp.), de 225 m<sup>2</sup>, no período das 07:00 às 14:00. A alimentação, oferecida duas vezes ao dia, consistiu em ração concentrada adequada para a categoria (garanhões em manutenção – 14% de proteína total – 1,0% do peso vivo), formulada segundo as recomendações do National Research Council (2007) e capim elefante, *coast cross* ou tifton com cana de açúcar picada (3,5% + 1% do peso vivo, respectivamente), sal mineral e água *ad libitum*. O controle de ecto e endoparasitas foi realizado de acordo com o programa sanitário do estabelecimento.

Para o congelamento dos ejaculados, foi utilizado o meio comercial Botu-Crio<sup>®1</sup> sem crioprotetor, constituindo esse o diluente base para os tratamentos 1 a 9. Os tratamentos testados diferiram quanto às proporções adicionadas dos crioprotetores dimetilformamida<sup>2</sup> e glicerol<sup>3</sup>, e a adição do antioxidante antocianina (ATC) e do complexo ciclodextrina-colesterol (CCC), associados ou não. Desta forma, os tratamentos foram distribuídos conforme segue:

- Grupo Glicerol (GLIC):

- Tratamento 1 (GA): Botu-Crio<sup>®</sup> sem crioprotetor + GLIC (5 %) + ATC (0,25 %) ;
- Tratamento 2 (GC): Botu-Crio<sup>®</sup> sem crioprotetor + GLIC (5 %) + CCC;
- Tratamento 3 (GAC): Botu-Crio<sup>®</sup> sem crioprotetor + GLIC (5 %) + ATC (0,25 %) + CCC.

- Grupo Dimetilformamida (DMFA):

- Tratamento 4 (DA): Botu-Crio<sup>®</sup> sem crioprotetor + DMFA (5 %) + ATC (0,25 %);
- Tratamento 5 (DC): Botu-Crio<sup>®</sup> sem crioprotetor + DMFA (5 %) + CCC;
- Tratamento 6 (DAC): Botu-Crio<sup>®</sup> sem crioprotetor + DMFA (5 %) + ATC (0,25 %) + CCC.

- Grupo Dimetilformamida-Glicerol (DG):

- Tratamento 7 (DGA): Botu-Crio<sup>®</sup> sem crioprotetor + DMFA (3 %) + GLIC (2 %) + ATC (0,25 %);
- Tratamento 8 (DGC): Botu-Crio<sup>®</sup> sem crioprotetor + DMFA (3 %) + GLIC (2 %) + CCC
- Tratamento 9 (DGAC): Botu-Crio<sup>®</sup> sem crioprotetor + DMFA (3 %) + GLIC (2 %) + ATC (0,25 %) + CCC.

- Grupo Testemunha (BC)

- Tratamento 10: Botu-Crio<sup>®</sup> comercial (glicerol a 1% associado à metilformamida a 4 %)

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em ensaio fatorial com tratamento adicional, sendo três crioprotetores, três aditivos e o Botu-Crio<sup>®</sup> como grupo testemunha (3 x 3 + 1).

Para as amostras destinadas aos tratamentos com adição do CCC, uma alíquota do ejaculado foi previamente diluído em meio Tyrode modificado (TALP, anexo B), de modo a se obter uma concentração de  $120 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Posteriormente, foi então adicionado 1,5 mg de CCC (30 µL) ao sêmen e este submetido a incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Passado esse período, o sêmen foi diluído em Botu-Sêmen<sup>®</sup> (diluição 1:2) e centrifugado a 600 g por 15 minutos, seguindo o protocolo de congelamento descrito a seguir.

## 2.2. Preparação do complexo ciclodextrina-colesterol (CCC)

O complexo ciclodextrina-colesterol foi preparada conforme descrito por Purdy & Graham (2004). Em um tubo, 1 g de metil-β-ciclodextrina<sup>4</sup> (MβCD) foi dissolvido em 2 mL de metanol<sup>5</sup>. Em outro tubo, 200 mg de colesterol<sup>6</sup> foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio<sup>7</sup>. Uma alíquota de 0,45 mL dessa solução foi então adicionada à solução de MβCD. A solução resultante foi homogeneizada até clarificação da mesma, seguida pela remoção dos solventes por evaporação, utilizando para tanto placa aquecedora a 40 °C por 48 horas. Os cristais resultantes foram removidos da placa por raspagem com auxílio de espátula e armazenados em temperatura ambiente até a sua utilização.

A solução de trabalho de CCC foi preparada a partir da adição de 50 mg de CCC em 1 mL de meio TALP incubado em banho Maria a 37 °C e homogeneizada por agitação com auxílio de agitador vortex. Essa solução foi mantida congelada a -20 °C até sua utilização, quando então foi previamente aquecida a 37 °C em banho maria e homogeneizada previamente à incubação com o sêmen.

### 2.3. 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 realizada de acordo com Cipriano (2011), de forma que 500 g de polpa de açaí foram centrifugados a 2500 g por 10 minutos, para separação dos sólidos insolúveis e lipídeos da fração aquosa. Ao sobrenadante foram adicionados 80 mL de etanol 70 % (1:2, sobrenadante/solvente) e o extrato acidificado com solução de ácido cítrico 6 % o suficiente para ajustar o pH do meio a 2,0. O extrato foi então deixado em repouso por 24 horas a 5 °C, ao abrigo da luz. Posteriormente, o material foi prensado manualmente em filtro de tecido fino de nylon e em papel Whatman nº 1 a vácuo, em funil Buchner, e o volume completado para 100 mL com a solução extratora. Após a filtração, o extrato foi purificado em três extrações sucessivas, formando o extrato concentrado.

O teor de antocianinas totais foi determinado por espectrofotometria, de acordo com Lees & Francis (1972). Uma alíquota do extrato concentrado foi diluída em etanol:HCl 1,5 N (85:15, v/v) e a absorbância lida no comprimento de onda de 535 nm em espectrofotômetro<sup>8</sup>. A diluição foi adotada de tal modo a se obter valor de absorbância entre 0,200 e 0,800, respeitando a Lei de Lambert-Beer. O espectrofotômetro foi calibrado com a solução etanol:HCl 1,5 N (85:15).

### 2.4. Colheita de sêmen

O esgotamento das reservas extra-gonádicas de todos os garanhões foi obtido mediante colheitas de sêmen diárias, por cinco dias consecutivos seguidos por dois dias de descanso sexual (STICH et al., 2002). As colheitas foram realizadas com vagina artificial (modelo Botucatu), previamente aquecida com água a 45 °C. Após cada colheita, foi retirada por filtração a fração gel do ejaculado e a avaliação imediata foi realizada considerando o aspecto, coloração, volume, concentração, motilidade espermática total e vigor espermáticos. O volume foi aferido em proveta graduada de 250 mL, previamente aquecida a 37 °C. A motilidade (%) e o vigor (0 - 5) espermáticos foram observados em microscópio óptico, com aumento de 200 x, utilizando-se 20 µL de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C. Uma alíquota

de 50 µL de sêmen foi diluída em 950 µL de solução formol-salina tamponada para determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer.

## 2.5. Congelamento de sêmen

Após as avaliações imediatas, o sêmen foi diluído em meio à base de leite desnatado<sup>9</sup> na proporção 1:1 e transferido para tubos Falcon de 15 mL, seguida de posterior centrifugação a 600 g por 15 minutos (SAMPAIO, 2012). Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e a concentração do pélete calculada em câmara de Neubauer. Após a determinação da concentração espermática, o pélete foi então homogeneizado com o diluente de congelamento do respectivo tratamento para uma concentração final de 50 milhões de espermatozoides por mL (CLULOW et al., 2008). As amostras foram envazadas em 10 palhetas francesas de 0,5 mL por tratamento, devidamente identificadas, e então, refrigeradas a 5 °C por 20 minutos, conforme Sampaio (2012). Após este período, as palhetas foram acondicionadas em vapor de nitrogênio, a 5 cm do nível da lâmina de nitrogênio líquido, por 15 minutos (LORENZONI, 2010) e posteriormente submersas em nitrogênio líquido, colocadas em raques e armazenadas em botijão criogênico.

## 2.6. Avaliação *in vitro* da viabilidade espermática

O descongelamento de sêmen foi realizado mediante imersão das palhetas em banho maria a 37 °C por 30 segundos e avaliados imediatamente conforme descrito para avaliação do sêmen fresco. Além dessas, foram realizadas as seguintes avaliações pós-descongelamento:

### 2.6.1. Teste de termorresistência (TTR)

O teste de termorresistência foi realizado mediante avaliações subjetivas da motilidade espermática total e do vigor espermático, em microscópio óptico, nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos após o descongelamento, conforme Fürst (2006). As amostras permaneceram em teste até que a motilidade se revelasse acima do limite inferior de 30 %, quando eram então retiradas do teste. Tal procedimento se deu em função do valor de referência para liberação de

sêmen criopreservado para utilização em programas de inseminação artificial (CBRA, 2013).

### 2.6.2. Citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo das amostras foi realizada em aparelho BD FACSVerser<sup>TM</sup> 10, 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 (Long Pass 507 nm / Band Pass 527/32 nm), B (LP 560 nm / BP 568/42 nm), C (LP 665 nm / BP 700/54 nm), D (LP 752 nm / BP 783/56 nm), E (LP 660 nm / BP 660/10 nm) e F (LP 752 nm / BP 783/56 nm).

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

As amostras foram primeiramente analisadas sem corantes, para que assim fosse determinado o local específico onde se localizava a população espermática, sendo este estipulado como padrão para análise. Em seguida, as sondas foram adicionadas de forma a identificar os espermatozoides marcados. Os testes foram repetidos até a obtenção de resultados coerentes com a viabilidade previamente conhecida do sêmen utilizado e, com isso, o melhor ajuste (compensação) obtido para cada sonda foi estipulado como padrão.

#### 2.6.2.1. Avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal (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 (MATYUS et al., 1984). Para avaliação da integridade acrossomal foi utilizada a aglutinina *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA), uma sonda incapaz de penetrar a membrana acrossomal intacta,

corando em verde somente aqueles espermatozoides reagidos ou com acrossoma lesionado (CROSS et al., 1986) ao se ligar em moléculas de  $\alpha$ -manose dispostas na matriz acrossomal (CELEGHINI et al., 2007).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, foi seguido o protocolo proposto por Oliveira et al. (2012) modificado. Uma alíquota de 150  $\mu$ L de sêmen diluído em PBS<sup>11</sup> ( $5 \times 10^6$  spz/mL) foi incubada com 10  $\mu$ L de FITC-PSA<sup>12</sup> (100  $\mu$ g/mL; anexo A) e 3  $\mu$ L de IP<sup>13</sup> (0,5 mg/mL; anexo A) em microtubos plásticos (2 mL) dispostos em banho maria a 37 °C, por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 150  $\mu$ L de PBS e a amostra destinada à leitura no aparelho. Em cada amostra foram analisadas 10.000 células, numa taxa de aproximadamente 200 células/segundo, nos filtros A (FITC-PSA, lesão acrossomal) e C (IP, lesão de membrana plasmática) e excitação de 488 nm.

Foi possível a observação de quatro categorias celulares (figura 1), de acordo com as combinações de lesão de membrana plasmática e de acrossoma: (UL) IP+PSA-, espermatozoides com membrana plasmática lesionada; (UR) IP+PSA+, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionada; (LR) IP-PSA+, espermatozoides com acrossoma lesionado; e (LL) IP-PSA-, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras.

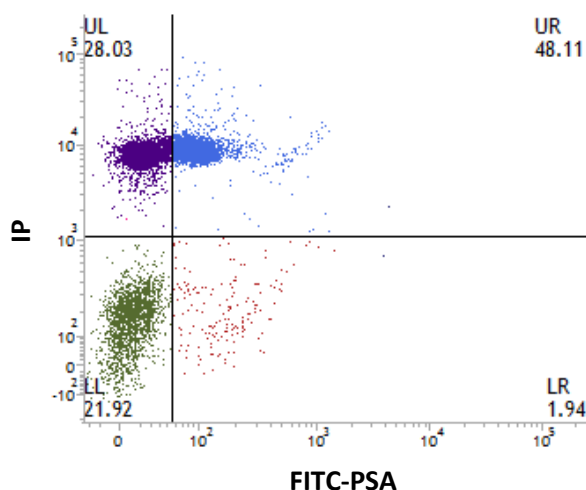


Figura 1: Gráfico de pontos (*dot-plots*) gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com IP e FITC-PSA, permitindo a classificação de espermatozoides em quatro categorias: LL, células viáveis; UL, células com membrana lesionada; UR, células com lesão de membrana e acrossoma; LR, células com acrossoma lesionado.

11. DMPBS, Flush, Nutricell®, Campinas, SP, Brasil  
12. L-0770, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA  
13. P-4170, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA

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

O potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) espermático foi avaliado mediante a utilização da sonda JC-1<sup>14</sup> (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 determinado de acordo com protocolo proposto por Ortega-Ferrusola et al. (2010) modificado. Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra previamente diluída em meio PBS ( $5 \times 10^6$  spz/mL) foi incubada com 0,5  $\mu\text{L}$  JC-1 (153  $\mu\text{M}$ ; anexo A) por 40 minutos em banho maria a 37 °C. Após esse período a amostra foi destinada à leitura no aparelho. Para cada amostra foram analisadas 30.000 células, 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.

Foi possível a classificação das células em três categorias: com alto, médio e baixo potencial mitocondrial. Para fins de análise estatística, foi considerado o somatório das células com potencial mitocondrial alto e médio (figura 2).

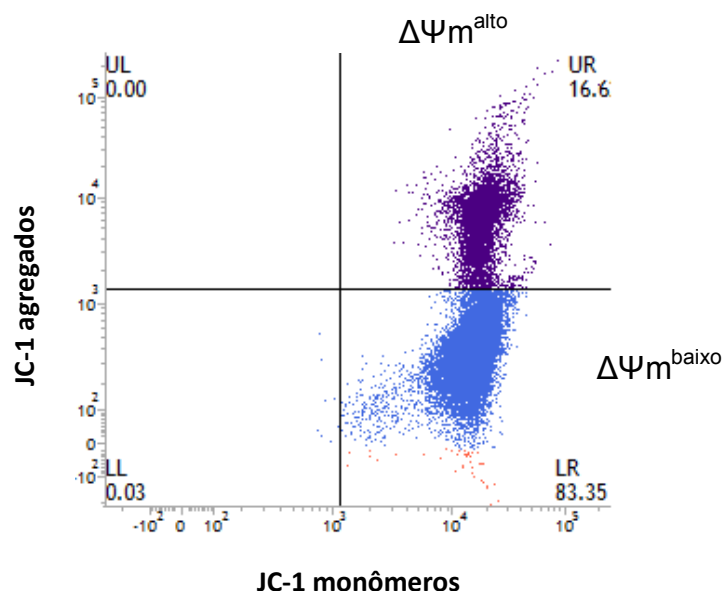


Figura 2: Gráfico de pontos (*dot-plots*) gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com JC-1, permitindo a classificação de espermatozoides com alto potencial mitocondrial (UR,  $\Delta\Psi_m^{\text{alto}}$ ) e baixo potencial mitocondrial (LR,  $\Delta\Psi_m^{\text{baixo}}$ ).

### 2.6.2.3. Avaliação da peroxidação da membrana espermática (C11-BODIPY<sup>581/591</sup>/IP)

A avaliação da peroxidação da membrana espermática foi realizada mediante utilização do fluoróforo ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-sindaceno-3-undecanoico (C11-BODIPY<sup>581/591</sup>), sonda que se incorpora prontamente em membranas biológicas (NEILD et al., 2005) e que responde ao ataque de radicais livres com uma reação irreversível que é quantificada pela citometria de fluxo como fluorescência verde (AITKEN et al., 2007).

Para análise da peroxidação das membranas, foi seguido o protocolo proposto por Oliveira et al. (2012). Uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  do sêmen diluído em meio PBS ( $5 \times 10^6$  spz/mL) foi adicionada a um microtubo (2,0 mL) aquecido em banho maria a 37 °C e corada com 0,5  $\mu\text{L}$  da sonda C11-BODIPY<sup>581/591</sup> (1 mg/mL; anexo A) por 30 minutos a 37 °C. Após esse período, uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  da amostra foi corada com 3  $\mu\text{L}$  de IP (0,5 mg/mL) como marcador das células com membrana plasmática lesada, permanecendo incubada por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de meio PBS e a amostra destinada à leitura no aparelho, onde foram analisadas 10.000 células, numa taxa de 400 células/segundo, com os filtros

(C11-BODIPY<sup>581/591</sup> peroxidado), B (C11-BODIPY<sup>581/591</sup> não peroxidado) e C (IP, células não viáveis) e excitação de 488 nm.

Foram observadas quatro categorias celulares, de acordo com as combinações de lesão de membrana plasmática e peroxidação de membrana (figura 3): (UL) IP+BODIPY-, espermatozoides mortos sem peroxidação da membrana plasmática; (UR) IP+BODIPY+, espermatozoides mortos com peroxidação da membrana plasmática; (LR) IP-BODIPY+, espermatozoides vivos com peroxidação da membrana plasmática; (LL) IP-BODIPY-, espermatozoides vivos sem peroxidação da membrana plasmática.

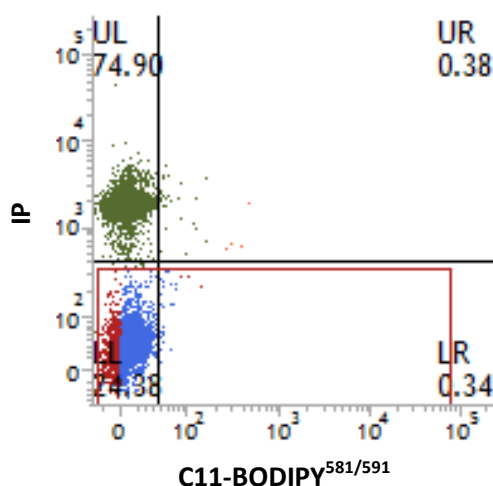


Figura 3: Gráfico de pontos (*dot-plots*) gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com PI e C11-BODIPY<sup>581/591</sup>, permitindo a classificação de espermatozoides em quatro categorias: LL, membrana íntegra sem peroxidação lipídica; UL, membrana lesionada sem peroxidação lipídica; UR, membrana lesionada com peroxidação lipídica; LR, membrana íntegra com peroxidação lipídica.

#### 2.6.2.4. Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular (DCFDA/IP)

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

Para avaliação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular, foi seguido protocolo proposto por Macías-García et al. (2012a). Uma alíquota de

500 µL da amostra diluída em meio PBS ( $5 \times 10^6$  spz/mL) foi adicionada a um microtubo (2,0 mL) aquecido em banho maria a 37 °C, e corada com 0,5 µL DCFDA<sup>16</sup> (1 mg/mL; anexo A) durante 30 minutos. Após esse período, 150 µL da amostra incubada foi corada com 3 µL de IP, permanecendo incubada por mais 5 minutos. Foram então adicionados 150 µL de PBS e seguiu-se a leitura no citômetro de fluxo, sendo contabilizadas 10.000 células de cada amostra, numa taxa de 400 células/segundo, com os filtros A (CFDA oxidado) e C (IP, células não viáveis) e excitação de 488 nm.

Foram observadas quatro populações celulares (figura 4a): (UL) IP+DCFDA-, espermatozoides mortos sem peróxido de hidrogênio intracelular; (UR) IP+DCFDA+, espermatozoides mortos com peróxido de hidrogênio intracelular; (LR) IP-DCFDA+, espermatozoides vivos com peróxido de hidrogênio intracelular; (LL) IP-DCFDA-, espermatozoides vivos sem peróxido de hidrogênio intracelular.

A fim de quantificar a concentração de peróxido de hidrogênio intracelular, foi realizada análise do histograma quanto à média de emissão do fluoróforo DCFDA pelas células viáveis captada no filtro A em relação a essa população (figura 4b).

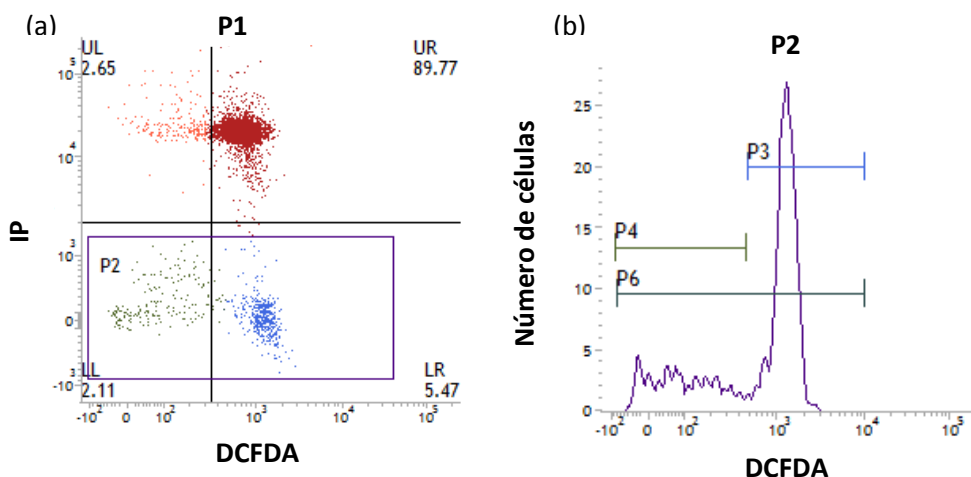


Figura 4: (a) Gráfico de pontos (*dot-plots*) gerado pela análise por citometria de fluxo, em amostra corada com IP e DCFDA, permitindo a classificação de espermatozoides em quatro categorias: LL, células com membrana plasmática íntegra sem peróxido de hidrogênio intracelular; UL, células com membrana lesionada sem peróxido de hidrogênio intracelular; UR, células com membrana lesionada com peróxido de hidrogênio intracelular; LR, células com membrana íntegra com peróxido de hidrogênio intracelular. (b) Histograma da população de células viáveis (P2) analisada quanto à distribuição da fluorescência emitida pelo DCFDA: P3,

células com peróxido de hidrogênio intracelular; P4, células sem peróxido de hidrogênio intracelular; P6, células viáveis.

## 2.7. Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em ensaio fatorial com tratamento adicional, sendo três diluentes-base, três aditivos e o Botu-Crio<sup>®</sup> como grupo testemunha (3 x 3 + 1). As variáveis quantitativas foram avaliadas por análise de variância, contrastes com único grau de liberdade foram usados para comparar os tratamentos, grupos de tratamentos (efeitos principais) bem como as interações de interesse, usando o *GLM procedure* (SAS, 2002). O vigor espermático (variável qualitativa) foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis usando o *NPAR1WAY procedure* (SAS, 2002). O nível de significância adotado foi  $\alpha = 0,05$ . As correlações de características de interesse foram analisadas por correlações simples de Pearson por meio do PROCCOR.

## 3. RESULTADOS

Não foram observadas interações entre os crioprotetores (glicerol e dimetilformamida) e aditivos (antocianina e ciclodextrina) utilizados nos diferentes tratamentos em relação à maioria das características estudadas. Em vista disso, os resultados serão expostos e discutidos quanto aos tratamentos de forma agrupada em função do crioprotetor ou aditivo, visando avaliar o efeito de cada um sobre a viabilidade e funcionalidade espermática pós-descongelamento.

### 3.1. Teste de termorresistência (TTR)

Em relação ao TTR, não houve interação ( $p > 0,05$ ) entre os efeitos de crioprotetor e aditivo nos intervalos de avaliação. Observou-se, entretanto, a ocorrência de efeitos isolados de crioprotetor e aditivo.

Quanto à motilidade inicial (MOT 0) observou-se que os tratamentos à base de DMFA apresentaram valores médios superiores em relação aos demais tratamentos, seguido pelo grupo DG que também diferiu daqueles à

base de GLIC e BC ( $p < 0,05$ ), que foram considerados inaptos à comercialização conforme recomendação do CBRA (2013). Após 30 minutos de exposição ao TTR, somente o grupo DMFA manteve motilidade espermática de acordo com o valor estipulado como limite para o teste (30 %), apresentando média superior aos demais grupos. Nesse tempo, os grupos BC e GLIC apresentaram as menores médias para motilidade espermática ( $p < 0,05$ ). A partir de 60 minutos de teste, os grupos DMFA e DG foram superiores aos grupos GLIC e BC ( $p < 0,05$ ) (tabela 1).

Tabela 1: Médias  $\pm$  erros padrão da motilidade e vigor espermáticos de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador criopreservados em diluentes com diferentes crioprotetores avaliadas mediante teste de termo resistência em intervalos de 30 minutos após o descongelamento.

Variáveis	BC	Crioprotetores		
		GLIC	DMFA	DG
MOT 0	29,9 $\pm$ 2,1 <sup>C</sup>	23,9 $\pm$ 1,1 <sup>D</sup>	44,5 $\pm$ 1,3 <sup>A</sup>	38,1 $\pm$ 1,4 <sup>B</sup>
VIG 0	2,9 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	2,7 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	3,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	3,0 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>
MOT 30	15,2 $\pm$ 2,1 <sup>C</sup>	10,0 $\pm$ 1,1 <sup>C</sup>	30,0 $\pm$ 1,5 <sup>A</sup>	23,9 $\pm$ 1,6 <sup>B</sup>
VIG 30	1,6 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	2,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
MOT 60	5,5 $\pm$ 1,6 <sup>B</sup>	4,7 $\pm$ 0,9 <sup>B</sup>	18,9 $\pm$ 1,5 <sup>A</sup>	16,1 $\pm$ 1,5 <sup>A</sup>
VIG 60	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	0,5 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,7 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	1,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
MOT 90	0,9 $\pm$ 0,6 <sup>B</sup>	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>B</sup>	7,3 $\pm$ 0,9 <sup>A</sup>	6,8 $\pm$ 1,0 <sup>A</sup>
VIG 90	0,1 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>

Letras maiúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

Letras minúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste de Kurskal Wallis ( $p < 0,05$ ).

GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrio® (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

Quanto ao vigor espermático, os grupos DMFA e GLIC apresentaram maior e menor média, respectivamente, ao descongelamento (VIG 0) ( $p < 0,05$ ; tabela 1). Após 30 minutos de descongelamento, o vigor espermático dos grupos DMFA e DG foram superiores ao do grupo BC, sendo que o grupo GLIC apresentou a menor média ( $p < 0,05$ ). A partir de 60 minutos após o descongelamento, o vigor espermático dos grupos DMFA e DG apresentaram-se superiores aos grupos BC e GLIC ( $p < 0,05$ ) (tabela 1).

Em relação aos aditivos, as maiores médias de motilidade espermática observadas imediatamente após o descongelamento (MOT 0) e aos 90 minutos deste foram referentes ao grupo AC e CCC ( $p < 0,05$ ), sendo que este último apresentou média similar também ao grupo ATC, que por sua vez igualou-se

ao grupo BC ( $p>0,05$ ). Aos 30 e 60 minutos após o descongelamento, os grupos CCC e AC apresentaram-se superiores aos demais ( $p<0,05$ ) (tabela 2).

Tabela 2: Médias  $\pm$  erros padrão da motilidade e vigor espermáticos de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador criopreservados em diluentes com diferentes aditivos avaliadas mediante teste de termo resistência em intervalos de 30 minutos após o descongelamento.

Variáveis	BC	Aditivos		
		ATC	CCC	AC
MOT 0	29,9 $\pm$ 2,1 <sup>C</sup>	33,3 $\pm$ 1,4 <sup>BC</sup>	35,5 $\pm$ 1,6 <sup>AB</sup>	37,7 $\pm$ 1,4 <sup>A</sup>
VIG 0	2,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	2,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	3,0 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
MOT 30	15,2 $\pm$ 2,1 <sup>B</sup>	17,6 $\pm$ 1,5 <sup>B</sup>	21,7 $\pm$ 1,7 <sup>A</sup>	24,6 $\pm$ 1,5 <sup>A</sup>
VIG 30	1,6 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	1,6 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>	2,1 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
MOT 60	5,5 $\pm$ 1,6 <sup>B</sup>	9,9 $\pm$ 1,2 <sup>B</sup>	14,4 $\pm$ 1,5 <sup>A</sup>	15,5 $\pm$ 1,4 <sup>A</sup>
VIG 60	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	1,0 $\pm$ 0,1 <sup>bc</sup>	1,3 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>	1,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
MOT 90	0,9 $\pm$ 0,6 <sup>C</sup>	3,2 $\pm$ 0,6 <sup>BC</sup>	5,3 $\pm$ 0,9 <sup>AB</sup>	6,2 $\pm$ 0,9 <sup>A</sup>
VIG 90	0,1 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	0,7 $\pm$ 0,1 <sup>ab</sup>	1,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>

Letras maiúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste F ( $p<0,05$ ).

Letras minúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste de Kurskal Wallis ( $p<0,05$ ).

ATC, antocianina à 0,25 %; CCC, colesterol carregado pela ciclodextrina; AC, antocianina à 0,25 % associada a colesterol carregado pela ciclodextrina; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

Em relação ao vigor espermático, não foram observadas diferenças entre os grupos de tratamento imediatamente após o descongelamento ( $p>0,05$ ). Após 30 minutos do descongelamento, o grupo AC e CCC apresentaram as maiores médias ( $p<0,05$ ), de forma que o grupo CCC apresentou-se similar aos demais grupos ( $p>0,05$ ), com exceção dos 90 minutos, onde o grupo testemunha (BC) apresentou a menor média dentre todos os tratamentos ( $p<0,05$ ) (tabela 2).

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

Não houve interação entre crioprotetor e aditivo mediante avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossomal ( $p>0,05$ ). Porém, houveram efeitos isolados quanto ao crioprotetor e aditivo sobre a integridade de membrana plasmática e acrossomal.

Os tratamentos à base de DMFA e DG proporcionaram melhor preservação da membrana plasmática e acrossomal, enquanto que o grupo GLIC apresentou as menores porcentagens de espermatozoides íntegros e o

grupo BC equivaleu-se aos grupos GLIC e DMFA ( $p < 0,05$ ). Em relação à população espermática com membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro, o grupo que apresentou os melhores resultados foi o DG, sendo equivalente aos grupos DMFA e GLIC enquanto os piores resultados foram observados no grupo BC, que também se equivaleu aos grupos DMFA e GLIC ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos de tratamentos em relação à população com membrana plasmática e acrossomal lesionadas ( $p > 0,05$ ) e a maior porcentagem de espermatozoides com acrossoma lesionado foi observada no grupo testemunha (BC;  $p < 0,05$ ) (tabela 3).

Tabela 3: Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de garanhões da raça Mangalarga Marchador, criopreservados em diluente com diferentes crioprotetores, avaliadas em por citometria de fluxo.

Variáveis	BC	Crioprotetores		
		GLIC	DMFA	DG
IP-PSA-	19,6 $\pm$ 1,9 <sup>BC</sup>	18,9 $\pm$ 1,5 <sup>C</sup>	25,0 $\pm$ 1,5 <sup>AB</sup>	27,3 $\pm$ 1,8 <sup>A</sup>
IP+PSA-	44,1 $\pm$ 5,4 <sup>A</sup>	39,8 $\pm$ 1,5 <sup>AB</sup>	38,8 $\pm$ 1,9 <sup>AB</sup>	35,6 $\pm$ 1,6 <sup>B</sup>
IP+PSA+	33,3 $\pm$ 6,2 <sup>A</sup>	38,1 $\pm$ 1,5 <sup>A</sup>	32,9 $\pm$ 2,3 <sup>A</sup>	33,1 $\pm$ 2,2 <sup>A</sup>
IP-PSA+	6,3 $\pm$ 1,1 <sup>A</sup>	3,6 $\pm$ 0,3 <sup>B</sup>	3,2 $\pm$ 0,3 <sup>B</sup>	4,1 $\pm$ 0,6 <sup>B</sup>

Letras maiúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste F ( $p < 0,05$ ). GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrió<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida). IP-PSA-, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras; IP+PSA-, espermatozoides com membrana plasmática lesionada; IP+PSA+, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionada; IP-PSA+, espermatozoides com acrossoma lesionado.

Em relação aos aditivos, foram observados menores percentuais de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras nos grupos BC, ATC e AC ( $p < 0,05$ ), de forma que esse último se equiparou ao grupo CCC ( $p > 0,05$ ). Não houve diferença entre os grupos em relação à população de células com membrana plasmática lesionada e acrossoma íntegro ( $p > 0,05$ ). O grupo ATC resultou na maior porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionadas ( $p < 0,05$ ), juntamente com os grupos BC e AC, porém foi o que apresentou a menor população com acrossoma lesionado e membrana íntegra, juntamente ao grupo AC ( $p < 0,05$ ). O grupo BC apresentou maior percentual médio de células com acrossoma lesionado e membrana intacta ( $p < 0,05$ ) (tabela 4).

Tabela 4: Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de garanhões da raça Mangalarga Marchador, criopreservados em diluente com diferentes aditivos, avaliadas em por citometria de fluxo.

Variáveis	BC	Aditivos		
		ATC	CCC	AC
IP-PSA-	19,6 $\pm$ 2,0 <sup>B</sup>	19,7 $\pm$ 1,4 <sup>B</sup>	25,6 $\pm$ 1,9 <sup>A</sup>	24,3 $\pm$ 1,8 <sup>AB</sup>
IP+PSA-	44,1 $\pm$ 5,4 <sup>A</sup>	38,7 $\pm$ 1,4 <sup>A</sup>	38,6 $\pm$ 1,9 <sup>A</sup>	37,3 $\pm$ 1,7 <sup>A</sup>
IP+PSA+	33,3 $\pm$ 6,2 <sup>AB</sup>	38,9 $\pm$ 1,5 <sup>A</sup>	31,5 $\pm$ 2,2 <sup>B</sup>	34,8 $\pm$ 1,9 <sup>AB</sup>
IP-PSA+	6,3 $\pm$ 1,1 <sup>A</sup>	2,7 $\pm$ 0,2 <sup>C</sup>	4,2 $\pm$ 0,4 <sup>B</sup>	4,0 $\pm$ 0,5 <sup>BC</sup>

Letras maiúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste F ( $p < 0,05$ ). ATC, antocianina à 0,25 %; CCC, colesterol carregado pela ciclodextrina; AC, antocianina à 0,25 % associada a colesterol carregado pela ciclodextrina; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida). IP-PSA-, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras; IP+PSA-, espermatozoides com membrana plasmática lesionada; IP+PSA+, espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesionada; IP-PSA+, espermatozoides com acrossoma lesionado.

### 3.3. Avaliação do potencial mitocondrial

Em relação ao potencial mitocondrial, observou-se que não houve interação entre crioprotetor e aditivo ( $p > 0,05$ ), embora tenha se observado a ocorrência de efeitos isolados de crioprotetor e aditivo.

A maior proporção de células com alto potencial mitocondrial (APM) foi observada nos grupos DMFA e DG ( $p < 0,05$ ), sendo que o grupo DMFA equiparou-se ao grupo BC e este, por sua vez, ao grupo GLIC ( $p > 0,05$ ). Já os grupos BC e GLIC apresentaram a maior porcentagem de células com baixo potencial mitocondrial (BPM) em relação aos grupos DMFA e DG ( $p < 0,05$ ), que foram semelhantes em relação a essa característica ( $p > 0,05$ ; tabela 5).

Tabela 5: Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação ao potencial mitocondrial de espermatozoides de garanhões da raça Mangalarga Marchador, criopreservados em diluente com diferentes crioprotetores, avaliadas em por citometria de fluxo.

Potencial Mitocondrial	BC	Crioprotetores		
		GLIC	DMFA	DG
APM	14,5 $\pm$ 3,9 <sup>BC</sup>	14,4 $\pm$ 2,0 <sup>C</sup>	22,6 $\pm$ 3,7 <sup>AB</sup>	24,0 $\pm$ 2,6 <sup>A</sup>
BPM	83,4 $\pm$ 3,6 <sup>A</sup>	83,9 $\pm$ 1,9 <sup>A</sup>	75,1 $\pm$ 3,5 <sup>B</sup>	73,0 $\pm$ 2,3 <sup>B</sup>

Letras maiúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste F ( $p < 0,05$ ). GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida). APM, alto potencial mitocondrial; BPM, baixo potencial mitocondrial.

Em relação aos aditivos, foi observada maior porcentagem de células com alto potencial mitocondrial (APM) nos grupos CCC e AC e menor nos grupos GLIC e BC ( $p < 0,05$ ). Os grupos BC e ATC apresentaram a maior população de células com baixo potencial mitocondrial (BPM) enquanto os grupos CCC e AC a menor ( $p < 0,05$ ; tabela 6).

Tabela 6: Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação ao potencial mitocondrial de espermatozoides de garanhões da raça Mangalarga Marchador, criopreservados em diluente com diferentes aditivos, avaliadas em por citometria de fluxo.

Potencial Mitocondrial	BC	Aditivos		
		ATC	CCC	AC
APM	14,5 $\pm$ 3,9 <sup>B</sup>	12,3 $\pm$ 1,9 <sup>B</sup>	23,8 $\pm$ 3,2 <sup>A</sup>	24,7 $\pm$ 2,5 <sup>A</sup>
BPM	83,4 $\pm$ 3,6 <sup>A</sup>	85,6 $\pm$ 1,8 <sup>A</sup>	74,2 $\pm$ 3,0 <sup>B</sup>	72,5 $\pm$ 2,2 <sup>B</sup>

-Letras maiúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste F ( $p < 0,05$ ).  
 ATC, antocianina à 0,25 %; CCC, colesterol carregado pela ciclodextrina; AC, antocianina à 0,25 % associada a colesterol carregado pela ciclodextrina; BC, BotuCrio® (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida).  
 APM, alto potencial mitocondrial; BPM, baixo potencial mitocondrial.

#### 3.4. Avaliação da peroxidação da membrana espermática

Em relação à peroxidação da membrana espermática, houve interação entre crioprotetor e aditivo ( $p < 0,05$ ) somente quanto à população de células viáveis peroxidadas (tabela 7). O aditivo CCC quando associado aos crioprotetores GLIC e DG resultou em maior porcentagem de células viáveis com membrana plasmática peroxidada quando comparada à associação desse aditivo ao crioprotetor DMFA ( $p < 0,05$ ), enquanto que os demais aditivos não influenciaram nessa população ( $p > 0,05$ ). Além disso, o tratamento a base de GLIC resultou em maior quantidade de espermatozoides com membrana peroxidada quando associado ao aditivo CCC, em relação aos demais aditivos ( $p < 0,05$ ). Já as demais associações entre crioprotetores e aditivos não diferenciaram entre si em relação à peroxidação de membrana de células viáveis ( $p > 0,05$ ), enquanto que a associação GLIC-CCC e DG-CCC foram as únicas que diferiram do grupo testemunho ( $p < 0,05$ ) (tabela 7).

Tabela 7: Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens da população de espermatozoides viáveis com peroxidação da bicamada lipídica, de sêmen criopreservados de garanhões da raça Mangalarga Marchados, avaliadas por citometria de fluxo.

BC	0,3 $\pm$ 0,1		
Aditivo	Diluyente		
	GLIC	DMFA	DG
ATC	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>Ba</sup>	0,7 $\pm$ 0,3 <sup>Aa</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>
CCC	0,9 $\pm$ 0,2 <sup>*Aa</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>Ab</sup>	1,0 $\pm$ 0,5 <sup>*Aa</sup>
AC	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>Ba</sup>	0,8 $\pm$ 0,4 <sup>Aa</sup>	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>

Letras maiúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma coluna diferem entre si pelo teste T ( $p < 0,05$ ).

Letras minúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste T ( $p < 0,05$ ).

\* sobre as médias diferem do grupo testemunha BC pelo teste T ( $p < 0,05$ )

GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; ATC, antocianina à 0,25 %; CCC, colesterol carreado pela ciclodextrina; AC, antocianina à 0,25 % associada a colesterol carreado pela ciclodextrina; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida).

Em relação às demais populações avaliadas por meio da sonda C11-BODIPY<sup>581/591</sup>, não houve interação entre crioprotetor e aditivo ( $p > 0,05$ ). Entretanto, foram observados efeitos isolados de crioprotetor e aditivo em relação à peroxidação de células não viáveis.

A população de células viáveis sem peroxidação de membrana plasmática foi maior em relação aos grupos DMFA, DG e BC, sendo que esse último apresentou médias similares ao grupo GLIC ( $p < 0,05$ ). A população com maiores percentuais de espermatozoides não viáveis sem peroxidação da membrana plasmática foram obtidas quanto aos grupos GLIC e BC, enquanto os grupos DG e DMFA apresentaram médias similares ao grupo BC para essa população ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças quanto à população de células não viáveis com membrana plasmática peroxidada ( $p > 0,05$ ) (tabela 8).

Tabela 8: Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à viabilidade e peroxidação da bicamada lipídica de sêmen criopreservados, em diluyente com diferentes crioprotetores, de garanhões da raça Mangalarga Marchados, avaliadas por citometria de fluxo.

Variáveis	BC	Crioprotetores		
		GLIC	DMFA	DG
IP-BODIPY-	27,8 $\pm$ 3,5 <sup>AB</sup>	22,3 $\pm$ 1,6 <sup>B</sup>	33,1 $\pm$ 2,3 <sup>A</sup>	32,7 $\pm$ 2,4 <sup>A</sup>
IP+BODIPY-	71,8 $\pm$ 3,6 <sup>AB</sup>	76,6 $\pm$ 1,7 <sup>A</sup>	66,0 $\pm$ 2,4 <sup>B</sup>	66,6 $\pm$ 2,4 <sup>B</sup>
IP+BODIPY+	0,1 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>	0,4 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

IP-BODIPY-, espermatozoides vivos sem lipoperoxidação; IP+BODIPY-, espermatozoides mortos sem lipoperoxidação; IP+BODIPY+, espermatozoides mortos com lipoperoxidação.

Em relação aos aditivos, os tratamentos que resultaram em maior proporção de células viáveis não peroxidadas foram os à base CCC, AC e BC ( $p < 0,05$ ). Esses grupos também conferiram menor percentual de espermatozoides não viáveis sem peroxidação da bicamada lipídica ( $p < 0,05$ ). Para ambas as populações, o grupo ATC apresentou médias similares ao grupo BC ( $p > 0,05$ ) e diferentes dos demais aditivos ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças quanto à população de células não viáveis e peroxidadas ( $p > 0,05$ ) (tabela 9).

Tabela 9: Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à viabilidade e peroxidação da bicamada lipídica de sêmen criopreservados, em diluente com diferentes aditivos, de garanhões da raça Mangalarga Marchados, avaliadas por citometria de fluxo.

Variáveis	BC	Aditivos		
		ATC	CCC	AC
IP-BODIPY-	27,8 $\pm$ 3,5 <sup>AB</sup>	22,7 $\pm$ 2,1 <sup>B</sup>	30,1 $\pm$ 1,9 <sup>A</sup>	32,7 $\pm$ 2,3 <sup>A</sup>
IP+BODIPY-	71,8 $\pm$ 3,5 <sup>AB</sup>	76,6 $\pm$ 2,2 <sup>A</sup>	68,6 $\pm$ 2,0 <sup>B</sup>	66,5 $\pm$ 2,4 <sup>B</sup>
IP+BODIPY+	0,1 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>A</sup>	0,6 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>	0,3 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>

Letras maiúsculas diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

ATC, antocianina à 0,25 %; CCC, colesterol carregado pela ciclodextrina; AC, antocianina à 0,25 % associada a colesterol carregado pela ciclodextrina; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

IP-BODIPY-, espermatozoides vivos sem lipoperoxidação; IP+BODIPY-, espermatozoides mortos sem lipoperoxidação; IP+BODIPY+, espermatozoides mortos com lipoperoxidação.

### 3.5. Avaliação da presença de peróxido de hidrogênio intracelular

Não houve interação entre crioprotetor e aditivo ( $p > 0,05$ ) em relação à presença de peróxido de hidrogênio intracelular. Entretanto, foram observados efeitos isolados quanto ao uso de crioprotetor e aditivo em relação à concentração de peróxido de hidrogênio intracelular e média de produção por célula viável.

Em relação aos crioprotetores, as populações de células sem peróxido de hidrogênio intracelular com ou sem membrana lesionada não apresentaram diferenças entre os grupos ( $p > 0,05$ ). O grupo GLIC, BC e DG apresentaram população com maior percentual de células não viáveis com alta concentração de peróxido de hidrogênio intracelular ( $p < 0,05$ ) e os grupos DMFA, DG e BC as menores populações com essa característica ( $p < 0,05$ ). Já a menor população de espermatozoides viáveis com alta concentração de peróxido de

hidrogênio intracelular foi observada no grupo testemunha, seguido pelo grupo GLIC, sendo a maior população com essa característica observada nos grupos DMFA e DG ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças quanto à média de emissão do fluoróforo pelas células viáveis ( $p > 0,05$ ), porém a proporção observada entre a emissão de fluoróforo pelas células viáveis em relação a essa população foi maior nos grupos tratados com GLIC, DG e BC e menor nos grupos DMFA, BC e DG ( $p < 0,05$ ) (tabela 10).

Tabela 10: Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção de peróxido de hidrogênio, de sêmen criopreservado em diluente com diferentes crioprotetores, de garanhões da raça Mangalarga Marchador, avaliadas por citometria de fluxo.

Variáveis	BC	Crioprotetores		
		GLIC	DMFA	DG
IP-DCFDA-	6,1 $\pm$ 2,8 <sup>A</sup>	5,1 $\pm$ 0,7 <sup>A</sup>	7,2 $\pm$ 1,6 <sup>A</sup>	4,7 $\pm$ 0,6 <sup>A</sup>
IP+DCFDA-	5,5 $\pm$ 2,9 <sup>A</sup>	6,8 $\pm$ 1,5 <sup>A</sup>	4,3 $\pm$ 0,6 <sup>A</sup>	3,5 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>
IP+DCFDA+	69,4 $\pm$ 7,0 <sup>AB</sup>	70,0 $\pm$ 2,9 <sup>A</sup>	60,5 $\pm$ 2,8 <sup>B</sup>	66,3 $\pm$ 2,3 <sup>AB</sup>
IP-DCFDA+	12,7 $\pm$ 2,0 <sup>C</sup>	18,1 $\pm$ 2,3 <sup>B</sup>	28,0 $\pm$ 3,1 <sup>A</sup>	25,5 $\pm$ 2,2 <sup>A</sup>
MEFv	1332,3 $\pm$ 551,6 <sup>A</sup>	1441,6 $\pm$ 221,2 <sup>A</sup>	1578,3 $\pm$ 467,0 <sup>A</sup>	1514,5 $\pm$ 239,2 <sup>A</sup>
MEFv/v	49,9 $\pm$ 15,6 <sup>AB</sup>	81,8 $\pm$ 16,8 <sup>A</sup>	45,5 $\pm$ 11,7 <sup>B</sup>	51,6 $\pm$ 7,2 <sup>AB</sup>

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

GLIC, glicerol à 5 %; DMFA, dimetilformamida à 5 %; DG, dimetilformamida à 3 % associada ao glicerol à 2 %; BC, BotuCrió<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

IP-DCFDA-, espermatozoides vivos sem peróxido de hidrogênio intracelular; IP+DCFDA-, espermatozoides mortos sem peróxido de hidrogênio intracelular; IP+DCFDA+, espermatozoides mortos com peróxido de hidrogênio intracelular; IP-DCFDA+, espermatozoides vivos com peróxido de hidrogênio intracelular.

MEFt, média de emissão do fluoróforo DCFDA pelas células viáveis; MEFt/v, relação entre a média de emissão do fluoróforo DCFDA pelas células viáveis/população de células viáveis

Em relação aos aditivos, foi observado maior proporção de células viáveis com presença de peróxido de hidrogênio intracelular nos grupos tratados com CCC ou AC, enquanto as menores proporções foram observadas nos grupos BC e ATC ( $p < 0,05$ ). Em relação às demais populações estudadas quanto à presença de peróxido de hidrogênio intracelular e intensidade de emissão do fluoróforo, não foram observadas diferenças entre os grupos de aditivos estudados ( $p > 0,05$ ) (tabela 11).

Tabela 11: Médias  $\pm$  erros padrão das porcentagens de populações espermáticas em relação à produção de peróxido de hidrogênio, de sêmen criopreservado em diluente contendo diferentes aditivos, de garanhões da raça Mangalarga Marchador, avaliadas por citometria de fluxo.

Variáveis	Botu Crio	Aditivos		
		ATC	CCC	AC
IP-DCFDA-	6,1 $\pm$ 2,8 <sup>A</sup>	6,3 $\pm$ 1,3 <sup>A</sup>	6,2 $\pm$ 0,9 <sup>A</sup>	4,0 $\pm$ 0,6 <sup>A</sup>
IP+DCFDA-	5,5 $\pm$ 2,9 <sup>A</sup>	6,6 $\pm$ 1,6 <sup>A</sup>	5,3 $\pm$ 1,0 <sup>A</sup>	3,1 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>
IP+DCFDA+	69,4 $\pm$ 7,0 <sup>A</sup>	70,6 $\pm$ 3,0 <sup>A</sup>	63,0 $\pm$ 2,2 <sup>A</sup>	65,3 $\pm$ 3,3 <sup>A</sup>
IP-DCFDA+	19,1 $\pm$ 5,6 <sup>B</sup>	16,5 $\pm$ 2,1 <sup>B</sup>	25,5 $\pm$ 2,2 <sup>A</sup>	27,6 $\pm$ 3,0 <sup>A</sup>
MEFv	1332,3 $\pm$ 551,6 <sup>A</sup>	1252,8 $\pm$ 347,6 <sup>A</sup>	1521,8 $\pm$ 271,7 <sup>A</sup>	1745,1 $\pm$ 263,7 <sup>A</sup>
MEFv/v	54,4 $\pm$ 17,5 <sup>A</sup>	63,4 $\pm$ 15,3 <sup>A</sup>	51,4 $\pm$ 8,9 <sup>A</sup>	72,0 $\pm$ 17,1 <sup>A</sup>

Letras diferentes sobre as médias dentro da mesma linha diferem entre si pelo teste F ( $p < 0,05$ ).

ATC, antocianina à 0,25 %; CCC, colesterol carregado pela ciclodextrina; AC, antocianina à 0,25 % associada a colesterol carregado pela ciclodextrina; BC, BotuCrio<sup>®</sup> (1 % de glicerol + 4 % de metilformamida)

IP-DCFDA-, espermatozoides vivos sem peróxido de hidrogênio intracelular; IP+DCFDA-, espermatozoides mortos sem peróxido de hidrogênio intracelular; IP+DCFDA+, espermatozoides mortos com peróxido de hidrogênio intracelular; IP-DCFDA+, espermatozoides vivos com peróxido de hidrogênio intracelular.

MEFt, média de emissão do fluoróforo DCFDA pelas células viáveis; MEFt/v, relação entre a média de emissão do fluoróforo DCFDA pelas células viáveis/população de células viáveis

#### 4. DISCUSSÃO

Os tratamentos à base de DMFA apresentaram os melhores resultados quanto à motilidade e vigor espermáticos, tanto ao descongelamento quanto após 30 minutos de TTR (queda de 44,5 para 30,0 % de motilidade e 3,2 para 2,4 de vigor; tabela 1), enquanto que, em relação à integridade de membranas plasmática e acrossomal, a DMFA também apresentou bons resultados, porém não diferindo dos valores médios obtidos nos tratamentos à base de DG (25,0 vs 27,3 % de espermatozoides íntegros, respectivamente; tabela 3). Já as amostras criopreservadas em diluidor contendo glicerol à 5 % apresentaram os piores resultados, tanto em relação à motilidade e vigor espermáticos pós-descongelamento (23,9 % e 2,7, respectivamente; tabela 1) quanto à integridade de membranas espermáticas (18,9 % de espermatozoides íntegros; tabela 3).

Tais resultados corroboram com estudos conduzidos por Medeiros (2003) e Gomes et al. (2002) ao compararem os efeitos do glicerol e amidas na criopreservação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, os quais são reconhecidos por apresentarem baixa congelabilidade diante da utilização do glicerol como crioprotetor. A superioridade da dimetilformamida em relação ao

glicerol na concentração de 5 % também foi reportada em estudos de fertilidade *in vivo*, que indicam a baixa eficiência desse crioprotetor em concentrações entre 5 % (MEDEIROS, 2003; MOFFET et al., 2003; VIDAMENT et al., 2005) e 7 % (PACE & SULLIVAN, 1975; DEMICK et al., 1976). Porém, quando a substituição do glicerol pela dimetilformamida ocorre em concentrações inferiores a 5 % de crioprotetor, os resultados obtidos apresentam-se contraditórios. Gibb et al. (2013) relataram aumento na motilidade espermática de sêmen congelado com 4 % de dimetilformamida em relação à mesma concentração de glicerol. Já Squires et al. (2004), ao compararem amidas com o glicerol a 0,55 M (aproximadamente 4 %), observaram superioridade desse agente em relação à motilidade espermática (61 vs 38 %, para glicerol e dimetilformamida, respectivamente); entretanto, ao aumentarem a concentração das amidas para 0,6 M (aproximadamente 5 %), as porcentagens de espermatozoides móveis apresentaram-se similares ao glicerol (54 %). Vale ressaltar que ambos os estudos utilizaram curvas de resfriamento mais longas (de 2 a 2,5 horas entre 4 e 5 °C), resultando em maior tempo para penetração dos crioprotetores, o que, no caso do glicerol, pode ser benéfico em função da sua maior viscosidade e conseqüente menor permeabilidade.

A ocorrência de resultados inferiores em relação à motilidade quando baixas concentrações de dimetilformamida são comparadas ao glicerol pode ser explicado pelo fato de as amidas possuírem menos sítios de ligação com a água do que o glicerol; com isso, tornam-se necessárias maiores concentrações desse agente para promoverem os mesmos efeitos crioprotetores do glicerol (NASH, 1996). Paralelamente, o fato das amidas compostos permearem mais facilmente a membrana plasmática resulta em menores danos osmóticos, o que pode, entretanto, não resultar em diferenças na motilidade espermática, quando esses crioprotetores são comparados nas mesmas concentrações.

Hoffman et al. (2011), ao avaliarem diferentes concentrações de crioprotetores no congelamento de sêmen de garanhões, observaram superioridade nas motilidades espermáticas progressivas quando as amostras foram submetidas à 2 ou 3 % de crioprotetor, dentre todos os testados (glicerol, etilenoglicol, metilformamida ou dimetilformamida). No presente estudo,

embora a motilidade espermática e integridade de membranas observada no tratamento contendo 5 % de glicerol tenha sido inferior à dos demais tratamentos (23,9 % e 18,9 %, respectivamente; tabelas 1 e 3), a presença deste agente à 2 % em associação à dimetilformamida à 3 % parece ter influenciado positivamente, possivelmente em função de algum sinergismo entre os crioprotetores. Medeiros (2003) e Morillo Rodriguez et al. (2012) também constataram efeito sinérgico entre glicerol e dimetilformamida ao relatarem superioridade no tratamento com maior concentração da amida (3,5 e 2,5 %, respectivamente) em relação ao glicerol (1,5 % em ambos os estudos).

A superioridade das amidas e suas associações com o glicerol a baixas concentrações têm sido relacionada às diferenças no mecanismo de ação dessas substâncias. Embora o glicerol e as amidas apresentem efeitos crioprotetores, suas propriedades são alcançadas por diferentes mecanismos. O glicerol, por ser um álcool com três grupamentos hidroxila funcionais, pode se ligar a seis moléculas de água em diferentes sítios de ligação (DALIMATA & GRAHAM, 1997). Além disso, segundo Kundu et al. (2000), o glicerol promove maior estabilização da membrana em função da capacidade de ligação dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila com os átomos de oxigênio dos grupos fosfato da membrana espermática. Porém, esses radicais hidroxila também podem ligar-se entre si, o que confere a alta viscosidade a essa substância, reduzindo a probabilidade de ligação com a água, o que é indesejável (KAROW, 2001). Já as amidas, formadas por grupos carbonila e amino, podem se ligar a três moléculas de água pela ligação com o hidrogênio, o que confere menor solubilidade e viscosidade. Associado a isso, seu menor peso molecular em comparação ao glicerol faz com que as amidas tenham maior permeabilidade na membrana, o que reduz as injúrias celulares causadas por danos osmóticos (BALL & VO, 2001).

Os resultados referentes ao potencial mitocondrial encontram-se diretamente relacionados à motilidade pós-descongelamento ( $r=0,58$ ;  $p<0,0001$ ), produção de peróxido de hidrogênio por células viáveis ( $r=0,70$ ;  $p<0,0001$ ) e integridade de membrana ( $r=0,68$ ;  $p<0,0001$ ). A maior porcentagem de células apresentando baixo potencial mitocondrial observada nos grupos BC e GLIC (83,4 e 83,9 %, respectivamente; tabela 5) é indicativa

da menor taxa metabólica dos espermatozoides congelados com esse agente, o que é refletido pela menor motilidade e a baixa proporção de células viáveis com alta concentração de peróxido de hidrogênio intracelular (23,9 – 29,9 % e 12,7 – 18,1 %, respectivamente; tabelas 1 e 10). Além disso, o tratamento GLIC resultou em alta proporção de peróxido de hidrogênio por célula viável (81,8; tabela 10), o que parece estar relacionado à baixa proporção de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras (18,9 %; tabela 3) e de células viáveis não peroxidadas (22,7 %; tabela 9).

A inibição da motilidade espermática em função do aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio intracelulares é consequência da redução na fosforilação de proteínas axonemais necessária para o movimento espermático (LAMIRANDE & GAGNON, 1992). Esse processo ocorre antes de qualquer perda de integridade de membrana ou aumento na peroxidação lipídica (HYSLOP et al., 1986; 1988), o que parece explicar a menor motilidade do tratamento DG em comparação ao DMFA (38,1 *versus* 44,5 %; tabela 1), em função da produção de peróxido de hidrogênio por célula viável.

A avaliação dos efeitos dos aditivos utilizados no presente estudo revelou que a CCC quando utilizada sozinha ou em associação à ATC resultou, de maneira geral, em maiores benefícios à viabilidade espermática, quando comparada ao uso somente da ATC ou ao grupo testemunho. Segundo Roca et al. (2004) a interação entre componentes dos diluentes e antioxidantes influencia na eficácia dos mesmos e dos crioprotetores. A maior motilidade espermática observada ao longo do TTR (tabela 2) é reflexo da maior proporção de espermatozoides com integridade de membrana plasmática e acrossomal (24,3 a 25,6 %; tabela 4), alto potencial mitocondrial (23,8 a 24,7 %; tabela 6) e de células viáveis com alta produção de peróxido de hidrogênio (25,5 a 27,6 %; tabela 11). Esses efeitos provavelmente se devem mais à ação da CCC do que da ATC, uma vez que o efeito da ATC não foi suficiente para melhorar tais características quando comparado ao grupo controle.

A incubação de espermatozoides com CCC previamente ao processo de criopreservação é associado a aumento na viabilidade celular (PAMORNSAKDA et al., 2011), integridade de membrana (MOORE et al., 2005) e motilidade espermática (MADISON et al., 2013; HARTWIG et al., 2014) em função do aumento na relação colesterol:fosfolípídeo que esse tipo de

tratamento acarreta. A presença de colesterol na membrana plasmática está diretamente relacionada à resistência osmótica durante o resfriamento em função da redução da temperatura de transição de fase (MOORE et al., 2005). Do mesmo modo, a utilização de ciclodextrinas para remoção de colesterol durante o descongelamento, resulta em aumento da temperatura da fase de transição inversa de 24 °C para 32 °C, reduzindo os danos causados à membrana plasmática (OLDENHOF et al., 2012). Com isso, o possível aumento na estabilidade da membrana espermática decorrente do tratamento com CCC pode ter resultado, como consequência, na maior proporção de células viáveis não peroxidadas na presença desse aditivo (30,1 a 32,7 %; tabela 9).

Quanto à avaliação da peroxidação de membrana das células viáveis entre os tratamentos, foi observada a ocorrência de interação entre os aditivos e os crioprotetores utilizados. A adição de ATC parece não ter apresentado nenhum efeito benéfico em relação aos crioprotetores, uma vez que quando esse aditivo foi associado aos crioprotetores não houve melhora em relação ao grupo controle (tabela 7). Porém, a adição da CCC ao tratamento GLIC e DG resultou em aumento na peroxidação das células viáveis (0,9 e 1,0 %, respectivamente; tabela 7). Tal fato pode ter relação com as alterações na permeabilidade da membrana plasmática aos crioprotetores e à água causadas pela incubação com CCC. Em estudo conduzido por Glazar et al. (2009) foi evidenciado que a incubação de espermatozoides de garanhões com 1,5 mg de CCC a 5 °C altera a permeabilidade da membrana plasmática, que se torna consideravelmente maior em relação à água quando na presença de glicerol. Sendo assim, é possível que a associação entre a CCC e os tratamentos em que o glicerol estava presente tenha resultado em maior dano osmótico à célula, em função de aumento na desidratação durante o resfriamento, suprimindo os efeitos benéficos da incorporação de colesterol na membrana plasmática. A comparação realizada entre os crioprotetores associados à CCC (dados não mostrados) revelou benefícios quando a adição desse composto foi feita ao diluente contendo DMFA quanto à integridade acrossomal e motilidades pós-descongelamento e após 30 minutos de TTR ( $p < 0,05$ ), reforçando a hipótese supracitada.

Embora não tenham sido observados os efeitos benéficos da ATC sobre motilidade, vigor, integridade de membrana plasmática e peroxidação lipídica, foi observada menor proporção de células com acrossoma lesionado quando utilizado esse aditivo (2,7 %; tabela 4). Diante desse fato, é possível inferir que a ATC pode ter exercido efeito benéfico sobre a membrana acrossomal, uma vez que se trata de região susceptível à peroxidação lipídica (JONES & MANN, 1977; BAUMBER et al., 2000; BALL, 2008) e que não é prontamente detectada pela sonda C11-BODIPY, pelo fato desta marcar, principalmente, a peroxidação ocorrida na peça intermediária do espermatozoide (NEILD et al., 2005).

Por outro lado, o fato do potencial mitocondrial das amostras tratadas com ATC ter se apresentado demasiadamente baixo (12,3 %; tabela 6) pode ser indicativo que esse aditivo tenha efetuado ação contrária ao almejado. Embora a maioria dos compostos fenólicos seja reconhecida como antioxidante, algumas dessas substâncias podem exercer atividade pró-oxidante em certas condições, como na presença de íons metais de transição (CAO & CUTLER, 1997). Existem evidências de que esses metais induzem à autoxidação de alguns compostos fenólicos gerando radicais e resultando em aumento da atividade redox na produção de ROS, incluindo  $H_2O_2$  (KOBASYASHI et al., 2004). Além disso, alguns antioxidantes fenólicos, como o resveratrol e a quercetina, induzem a liberação de cálcio no meio intracelular (BREITBART & RUBINSTEIN, 1983; BREITBART et al., 1985), de acordo com a concentração do polifenol (LIU et al., 2005). Sendo assim, essas substâncias podem evitar ou estimular a capacitação espermática prematura e reação acrossomal, uma vez que esses processos são regulados pelas concentrações de cálcio intracelular (BREITBART et al., 1985).

Diante do exposto e considerando que o tratamento à base de ATC implicou nas maiores porcentagens de espermatozoides com lesão de membrana plasmática e acrossomal concomitantes (38,9 %; tabela 4) e que essa característica apresentou correlação significativa e inversa ( $r=-0,55$ ;  $p<0,05$ ) com o percentual de células viáveis não peroxidadas dentre as amostras agrupadas nesse tratamento, é possível que a concentração utilizada no presente estudo tenha sido inadequada para obtenção da ação antioxidante da ATC.

## 5. CONCLUSÃO

Os diluentes contendo 5 % de dimetilformamida e a associação de dimetilformamida (3 %) com glicerol (2 %) apresentaram melhores condições para manutenção da viabilidade espermática *in vitro*, de forma que a adição de colesterol carregado por ciclodextrina deve ser feita preferencialmente em meio de congelamento contendo dimetilformamida como crioprotetor. Os resultados obtidos quanto à ação da ATC não foram satisfatórios, sendo necessários novos estudos quanto à concentração ideal e seus efeitos no congelamento de sêmen de garanhões.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSOY, M.; AKMAN, O.; LEHIMCIOGLU, N. C.; ERDEM, H. Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 166-172. 2010.

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

ÁLVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 338-348. 1987.

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

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

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

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

BREITBART, H.; RUBINSTEIN, S.; NASS-ARDEN, L. The role of calcium and Ca<sup>2+</sup>-ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry*, v. 260, p.11548-11553. 1985.

BREITBART, H.; RUBINSTEIN, S. Calcium transport by bull spermatozoa plasma membranes. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 732, p. 464-468. 1983.

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.

CAO, G.; CUTLER, R. G. High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 17, p. 189–201. 1997.

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

CIPRIANO, P. A. **Antocianinas de açaí (Euterpe oleracea Mart.) e casa de jaboticaba (Myrciaria jaboticaba) na formulação de bebidas isotônicas.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), 2011, 131 f. Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2011.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. **Theriogenology**, v. 49, p.831-841. 1997.

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

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

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

FAHY, G. M.; LEVY, D. I.; ALI, S. E. Some emerging principles underlying the physical properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. **Cryobiology**, v. 24, p. 196-213. 1987.

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

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

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

GOMES, G. M.; JACOB, J. C. F.; MEDEIROS, A. S.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with

alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279. 2002.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America Equine Practitioners**, v. 12, p. 131-147. 1996.

GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H.; HOUGH, S. R. Penetration of zona-free hamster eggs by liposome-treated sperm from the bull, ram, stallion and boar. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 181-188. 1987.

GRAY, J. E.; STARMER, J.; LIN, V. S.; DICKINSON, B. C.; MAGNUSON, T. Mitochondrial Hydrogen Peroxide and Defective Cholesterol Efflux Prevent In Vitro Fertilization by Cryopreserved Inbred Mouse Sperm. **Biology of Reproduction**, v. 89, p. 1-12. 2013.

GRIVEAU, J. F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; CALLEGARI, J. P.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 17-26. 1995.

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

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

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88. 1990.

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.

HYSLOP, P. A.; HINDSHAW, D. B.; HALSEY, W. A.; SCHRAUFSTATTER, I. U.; SAUERHEBER, R. D.; SPRAGG, R. G.; JACKSON, J. H.; COCHRANE, C. G. Mechanisms of oxidant mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 1665-1675. 1988.

HYSLOP, P. A.; HINDSHAW, D. B.; SCHRAUFSTATTER, I. U.; SAUERHEBER, R. D.; SKLAR, L. A.; SPRAGG, R. G.; COCHRANE, C. G. Intracellular calcium homeostasis during hydrogen peroxide injury to cultured P388D1 cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 129, p.356-366. 1986.

JONES, R., MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-268. 1977.

KAROW, A. M. **Cryobiology 2001 for mammalian embryologists**. Georgia, USA: Augusta; 2001. p.1-38.

KOBAYASHI, H.; OIKAWA, S.; HIRAKAWA, K.; KAWANISHI, S. Metal mediated oxidative damage to cellular and isolated DNA by gallic acid, a metabolite of antioxidant propyl gallate. **Mutation Research**, v. 558, p. 111-120. 2004.

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.

LAMIRANDE, E.; EILEY, D.; GAGNON, C. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 258-266. 1993.

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

LEES, D. H.; FRANCIS, F. G. Standardization of pigment analysis in cranberries. **Hortiscience**, v. 7, p. 83-84. 1972.

LI, G.; SAENZ, J.; GODKE, R. A.; DEVIREDDY, R. V. Effect of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa. **Reproduction**, v. 131, p. 875-886. 2006.

LIU, Z.; ZHANG, L. P.; MA, H. J.; WANG, C.; LI, M.; WANG, Q. S. Resveratrol reduces intracellular free calcium concentration in rat ventricular myocytes. **Acta Physiologica Sinica**, v. 57, p. 599-604. 2005.

MADISON, R. J.; EVANS, L. E.; YOUNGS, C. R. The effect of 2-hydroxypropyl-cyclodextrin on post-thaw parameters of cryopreserved jack and stallion semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 272-278. 2013.

MCNIVEN, M. A.; RICHARDSON, G. F. Chilled storage of stallion semen using perfluorochemicals and antioxidants. **Cell Preservation Technology**, v.1, p. 165-174. 2003.

MEDEIROS, A.S.L. **Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões**. 2003, 123 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2003.

MEGLI, F. M.; CONTE, E.; ISHIKAWA, T. Cholesterol attenuates and prevents bilayer damage and breakdown in lipoperoxidized model membranes. A spin labeling EPR study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 2267-2274. 2011.

MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J. K. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. **Reproduction of Domestic Animals**, Suppl. 2, v. 45, p. 57-66. 2010.

MOFFET, P. D.; BRUEMMER, J. E.; CARD, C.; SQUIRES, E. L. Comparison of dimethylformamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 2003, **Proceedings...** Columbus: Society for Theriogenology, 2003. p. 42.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v. 51, p. 241-249. 2005.

MORRILLO RODRIGUEZ, A.; BALAO DA SILVA, C.; MACÍAS-GARCÍA, B.; GALLARDO BOLAÑOS, J. M.; TAPIA, J. A.; APARICIO, I. M.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; PEÑA, F. J. Dimethylformamide improves the in vitro characteristics of thawed stallion spermatozoa reducing sublethal damage. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 47, p. 995-1002. 2012.

MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; PINCEMY, G.; KURZ, A.; LABBE, C. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 390-399. 2008.

MURPHY, C.; ENGLISH, A. M.; HOLDEN, S. A.; FAIR, S. Cholesterol-loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 145, p. 123-129. 2014.

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, p.179-220. 1966.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of horse**. 6<sup>th</sup> ed. Washington, DC: National Academy Press, 2007. 360 p.

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

OLDENHOF, H.; FRIEDEL, K.; AKHOONDI, M.; GOJOWSKY, M.; WOLKERS, W. F.; SIEME, H. Membrane phase behavior during cooling of stallion sperm and its correlation with freezability. **Molecular Membrane Biology**, v. 29, p. 95-106. 2012.

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

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

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

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

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

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78, Suppl., p. 570S-578S. 2003.

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

ROCA, J.; GIL, M. A.; HERNANDEZ, M.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 397-405. 2004.

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

SIEME, H.; MARTINSSON, G.; RAUTERBERG, H.; WALTER, K.; AURICH, C.; PETZOLDT, R.; KLUG, E. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozen-thawed stallion semen. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 38, p. 134-140. 2003a.

SIEME, H.; SCHÄFER, T.; STOUT, T. A. E.; KLUG, E.; WABERSKI, D. The effect of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 1153-1164. 2003b.

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

SRIVASTAVA, N.; SRIVASTAVA, S. K.; GHOSH, S. K.; KUMAR, A.; PERUMAL, P.; JEROME, A. Acrosome membrane integrity and

cryocapacitation are related to cholesterol content of bull spermatozoa. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 2, p. 126-131. 2013.

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.

VIDAMENT, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 115-136. 2005.

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

## ANEXOS

### ANEXO A

#### Diluições das sondas utilizadas na citometria de fluxo

##### 1. IODETO DE PROPÍDEO (IP)

Solução estoque (25 mg/mL = 40 mM)  
25 mg PI + 1 mL DMSO

Solução de trabalho (0,5 mg/mL = 0,8 mM)  
20 uL SE + 980 uL PBS

##### 2. FITC-PSA

Solução estoque (0,5 mg/mL)  
2 mg FITC-PSA + 4 mL PBS

Solução de trabalho (100 ug/mL)  
2 mg FITC-PSA + 20 mL PBS

##### 3. JC-1

Solução estoque (1,53 mM)  
5 mg JC1 + 5 mL DMSO

Solução de trabalho (153 uM)  
100 uL SE + 900 uL DMSO

##### 4. C11-BODIPY<sup>581/591</sup>

Solução de trabalho (1 mg/mL)  
1 mg C11-BODIPY<sup>581/591</sup> + 1 mL etanol

##### 5. DCFDA

Solução estoque I (50 mg/mL)  
1 g DCFDA + 20 mL DMSO

Solução estoque II (5 mg/mL)  
1 mL SE I + 9 mL DMSO

Solução de trabalho (1 mg/mL)  
1 mL ST I + 4 mL DMSO

##### 6. MEROCIANINA

Solução estoque (1 mg/mL)  
1 mg MERO + 1 mL DMSO

Solução de trabalho (0,5 mg/mL)  
1 mL SE + 1 mL DMSO

## ANEXO B

### Meio Tyrode modificado (TALP)

<b>Componente</b>	<b>Quantidade</b>
NaCl.....	2,16 g
KCl.....	0,75 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,16 g
NaHCO <sub>3</sub> .....	3,0 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,29 g
HEPES.....	2,4 g
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O.....	0,25 g
Frutose.....	15,2 g
Glucose.....	1,0 g
Na Piruvato.....	0,02 g
Na Lactato.....	3,7 mL
Albumina Sérica Bovina (BSA).....	3,0 g
Água destilada.....	1000 mL

\* Osmolaridade (300-310 mOsm/Kg)

\* pH (7,2 – 7,4)