

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**ADIÇÃO DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) E ÁCIDO EICOSANÓICO
(EPA) EM MEIO DILUENTE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA**

LIDIA DUTRA FARIAS

PORTO ALEGRE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

**ADIÇÃO DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) E ÁCIDO EICOSANÓICO
(EPA) EM MEIO DILUENTE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA**

LIDIA DUTRA FARIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, da Faculdade de Veterinária da UFRGS, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal: Equinos na área de Reprodução Equina, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Sandra Fiala Rechsteiner.

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Farias, Lídia Dutra
ADIÇÃO DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) E ÁCIDO
EICOSANÓICO (EPA) EM MEIO DILUENTE NA CRIOPRESERVAÇÃO
DE SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA / Lídia Dutra
Farias. -- 2018.
56 f.
Orientadora: Sandra Fiala Rechsteiner.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. ácidos graxos poli-insaturados. 2.
criopreservação. 3. sêmen. 4. espermatozoides. 5.
fertilidade. I. Rechsteiner, Sandra Fiala, orient.
II. Título.

LIDIA DUTRA FARIAS

**ADIÇÃO DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) E ÁCIDO EICOSANÓICO
(EPA) EM MEIO DILUENTE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE
GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA**

APROVADO POR:

Prof^a. Dr^a. Sandra Fiala Rechsteiner
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof^a. Dr^a. Anelise Hammes Pimentel
Membro da Comissão

Prof. Dr. Nelson Alexandre Kretzmann Filho
Membro da Comissão

Dr. Henrique Boll de Araujo Bastos
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida, por toda a saúde, força e fé, por terem me garantido determinação para prosseguir em busca de conhecimentos;

Aos meus avôs, Serafim Antônio Farias e Ewerton Duarte Dutra, agradeço por iluminarem o meu caminho;

Aos meus pais, meus maiores exemplos, meu eterno agradecimento pelo amor incondicional, sem eles com certeza não teria chegado até aqui e não seguiria em frente;

À minha irmã Bibiana e meu cunhado Rodrigo, por estarem sempre ao meu lado e terem me dado um dos meus maiores presentes, meu sobrinho e afilhado Ramiro, o qual agradeço pelo sorriso de todos os dias;

Aos meus familiares e amigos, pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo, por todo o apoio e compreensão nos momentos em que foi necessário, por jamais deixarem de acreditar em minhas vitórias;

Aos professores que tive ao longo da vida, por todos os ensinamentos, pelo equilíbrio e dedicação, e aos mestres que tive fora da faculdade, pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos, por todas as oportunidades e experiências divididas;

À minha orientadora Prof.^a. Dr.^a. Sandra Fiala Rechsteiner, pela orientação, paciência e apoio fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho, também pela amizade e confiança;

Às colegas Carolina Litchina Brasil, Karina Lemos Goularte e Verônica La Cruz Bueno, e ao Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori, pela disponibilidade e colaboração na execução deste projeto;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de estudo, e à Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos, pelo auxílio financeiro concedido para realização do projeto de pesquisa;

Enfim, sem encontrar palavras, também agradeço ao meu amor Thiago, ele que compartilhou comigo muitos sentimentos e momentos ao longo desta caminhada, e à nossa filha Luiza.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios e desvios padrão das variáveis de cinética espermática pós-descongelamento de sêmen equino congelado em diferentes tratamentos: controle e as diferentes concentrações de DHA (25µm/mL (DHA25) e 50µm/mL (DHA50)) e EPA (25µm/mL (EPA25) e 50µm/mL (EPA50)) 36

Tabela 2: Valores médios e desvios padrão das variáveis integridade de membrana e teste hiposmótico pós-descongelamento de sêmen equino congelado em diferentes tratamentos: controle e as diferentes concentrações de DHA (25µm/mL (DHA25) e 50µm/mL (DHA50)) e EPA (25µm/mL (EPA25) e 50µm/mL (EPA50)) 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
μl	Microlitro
μM	Micrometro
ABCCC	Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos
ALH	Amplitude de Deslocamento Lateral de Cabeça
BCF	Frequência de Batimento Flagelar Cruzado
CASA	Análise Computadorizada para Avaliação Espermática
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
cm	Centímetros
DHA	Ácido docosahexaenóico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EPA	Ácido eicosanóico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
g	Gramas
HOST	Teste Hiposmótico
IMP	Integridade física da membrana plasmática
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
LIN	Linearidade
MC	Motilidade Local
ML	Motilidade Lenta
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MP	Motilidade Progressiva
MR	Motilidade Rápida
MT	Motilidade Total
PI	Iodeto de Propídio
PNA	Aglutinina <i>Peanut agglutinin</i>

PSA	Aglutinina <i>Pisum sativum</i>
PUFAs	Ácidos graxos polinsaturados
R123	Rodamina 123
RCA	Aglutinina <i>Ricinus communis</i>
SAS	Software de Análises Estatísticas
STR	Retilinearidade
VAP	Velocidade Média da Trajetória
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade Linear Progressiva

ADIÇÃO DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) E ÁCIDO EICOSANÓICO (EPA) EM MEIO DILUENTE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA

RESUMO

Em equinos é descrita uma variabilidade na qualidade do sêmen congelado, relacionada principalmente a variações consideráveis na composição da membrana plasmática do espermatozoide. Neste contexto, estudos investigam alternativas para aumentar a fertilidade ao se usar sêmen congelado, e a adição de ácidos graxos poli-insaturados ao diluente de congelamento é sugerida. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de ácidos graxos poli-insaturados: ácido eicosanóico e ácido docosahexaenóico, em meio diluente específico para a espécie sobre as características do espermatozoide pós-descongelamento. Foi utilizado sêmen de quatro garanhões (quatro ejaculados por garanhão) da raça Criola. O sêmen foi diluído em diluente de congelamento comercial a base de gema de ovo, glicerol e dimetilformamida (Botu-Crio©) ajustando a concentração para 200×10^6 espermatozoides viáveis/mL (grupo controle) e, na sequência, os demais tratamentos: adição de ácido docosahexaenóico nas doses $25\mu\text{m}$ e $50\mu\text{m}$ /mL e ácido eicosanóico nas doses $25\mu\text{m}$ e $50\mu\text{m}$ /mL. Após o descongelamento foram realizadas análises de cinética espermática no sistema de Análise Computadorizada para Avaliação Espermática, das seguintes variáveis: motilidade total, motilidade progressiva, motilidade rápida, motilidade lenta, motilidade local, velocidade de trajeto, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, amplitude do deslocamento lateral da cabeça, frequência de batimentos, retilinearidade e linearidade; e avaliação da integridade física através do uso de sondas fluorescentes, e funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico. Não houve diferença nas variáveis avaliadas. Este é o primeiro estudo que descreve a adição de ácido eicosanóico ao sêmen equino. Concluiu-se a adição de ácido docosahexaenóico e eicosanóico nas concentrações testadas não alterou as variáveis avaliadas no sêmen de garanhões da raça Criola.

Palavras-chave: ácidos graxos poli-insaturados, criopreservação, sêmen, espermatozoides, fertilidade, garanhão.

ADDITION OF DOCOSAHEXAENOIC ACID (DHA) AND EICOSANOIC ACID (EPA) IN THE MEDIUM DILUTE IN THE CRIOPRESERVATION OF SEMEN OF CRIOULA RACE STALLIONS

ABSTRACT

In equines, a variability in the quality of frozen semen is described, mainly related to the considerable variations in the composition of the sperm plasma membrane. In this context, studies investigate alternatives to increase fertility when using frozen semen, and the addition of polyunsaturated fatty acids to the freezing diluent is suggested. The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of different levels of polyunsaturated fatty acids: eicosanoic acid and docosahexaenoic acid, in specific diluent medium for the species on the characteristics of the post-thawing spermatozoa. Semen was used of four stallions (four ejaculates per stallion) of the Crioula breed. The semen was diluted in commercial freezing diluent based on egg yolk, glycerol and dimethylformamide (Botu-Crio ©) by adjusting the concentration to 200×10^6 viable spermatozoa / mL (control group) and, in sequence, the other treatments: addition of docosahexaenoic acid at $25\mu\text{m}$ and $50\mu\text{m}$ / mL and eicosanoic acid at $25\mu\text{m}$ and $50\mu\text{m}$ / mL. After thawing, sperm kinetics analyzes were performed in the Computerized Analysis System for Sperm Evaluation, of the following variables: total motility, progressive motility, rapid motility, slow motility, local motility, path velocity, progressive velocity, curvilinear velocity, lateral head displacement amplitude, beating frequency, linearity and linearity; and evaluation of physical integrity through the use of fluorescent probes, and membrane functionality by the hyposmotic test. No difference in the variables evaluated. This is the first study to describe the addition of eicosanoic acid to equine semen. We concluded that with the addition of docosahexaenoic and eicosanoic acid at the concentrations tested did not alter the variables evaluated in the semen of Crioula stallions.

Key words: polyunsaturated fatty acids, cryopreservation, semen, sperm, fertility, stallion.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Raça Crioula.....	14
2.2 O espermatozoide.....	15
2.3 A criopreservação de sêmen equino.....	17
2.3.1 Danos causados ao sêmen equino pela criopreservação.....	19
2.3.2 Diluentes e crioprotetores utilizados na criopreservação de sêmen equino	21
2.3.3 Antioxidantes na criopreservação de sêmen equino.....	25
2.4 Métodos de avaliação do sêmen.....	28
2.4.1 Motilidade espermática	28
2.4.2 Integridade funcional da membrana – Teste hiposmótico.....	29
2.4.3 Integridade física das membranas – Sondas fluorescentes.....	30
3. ARTIGO.....	32
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

A população mundial de equinos, estimada pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO (2016) em 59.048.194 cabeças, encontra-se estável nas últimas décadas. Nas Américas, é evidente a concentração da produção e utilização dos equinos (aproximadamente 54% da população mundial); e o Brasil, com mais de cinco milhões de cabeças de equinos, possui o maior rebanho da América do Sul, e no cenário mundial ocupa o 4º lugar (FAO, 2016).

O Brasil é reconhecido como potência mundial no agronegócio e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento classificou a Equinocultura Brasileira como parte integrante da atividade pecuária em virtude de sua importância econômica e social. No país, o chamado “Complexo do Agronegócio Cavalo” é responsável por movimentar R\$ 16,15 bilhões anuais e gerar, direta e indiretamente, 3 milhões de empregos (LIMA e CINTRA, 2015).

A raça Crioula, acompanhando o forte crescimento da equinocultura no Brasil, apresentou importante evolução na quantidade e qualidade do plantel nos últimos anos. Após quase 90 anos de história, conforme dados da Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC, 2017a), são mais de 400 mil exemplares registrados distribuídos em todo o território brasileiro. Estimou-se que a raça movimenta anualmente mais de R\$ 1,28 bilhões/ano e gera mais de 238 mil postos de trabalho no país (LIMA, 2012). Adicionalmente, só no último ano foi descrito um crescimento de mais de 20% em número de eventos (mais de 1 mil realizados) e acima de 40% em comercialização de animais (ABCCC, 2018).

O incremento da criação de equinos mundial e nacional descrito se deve, em parte, ao desenvolvimento e utilização de biotecnologias da reprodução, as quais permitem um aumento da eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, ganhos na produção, além de intensificar e facilitar o melhoramento genético dos animais.

Neste contexto, uma das importantes etapas é o desenvolvimento de técnicas adequadas para a preservação e armazenamento de sêmen devido aos amplos benefícios proporcionados. O uso de sêmen congelado, além de possibilitar a conservação e utilização do material genético de reprodutores por tempo indeterminado, favorece a sua difusão, oportunizando a maximização do potencial genético de garanhões superiores; elimina barreiras geográficas, reduzindo riscos e custos com aquisição e transporte de animais e

viabilizando a inseminação artificial no momento ideal na tentativa de maximizar a fertilidade; permite o uso de sêmen de garanhões impossibilitados de serem utilizados com fins reprodutivos, seja temporariamente ou permanentemente; e ainda facilita o controle de doenças (AMANN e PICKETT, 1987; SQUIRES, 2009; GIBB e AITKEN, 2016; ALVARENGA et al., 2016; YIMER et al., 2016). O emprego da biotecnologia relatada ainda possibilita a criação de um banco de recursos genéticos (BAILEY et al., 2000; YIMER et al., 2016) e está relacionada ao sucesso de outras biotecnologias (GIBB e AITKEN, 2016; SIELHORST et al., 2016; YIMER et al., 2016).

Em contrapartida, é com base no pedigree, performance e conformação que são selecionados os cavalos para uso na reprodução, não levando em consideração aspectos reprodutivos. Criadores raramente incluem fertilidade como critério de seleção para tomada de decisões para acasalamentos (GIBB e AITKEN, 2016) e na maioria das raças não há licenciamento ou aprovação de garanhões, levando a um alto número de garanhões subfêrteis por uma série de razões, algumas delas geneticamente transmitidas durante muitas gerações (LOOMIS, 2006).

Posteriormente a aprovação da inseminação artificial pela maioria das associações das raças de equinos, a utilização da técnica foi amplamente difundida entre os criatórios desta espécie. Entretanto, apesar dos constantes estudos e inúmeras vantagens, o uso do sêmen criopreservado de garanhões ainda apresenta resultados de fertilidade variáveis (AMANN e PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996; SQUIRES et al., 2004; LOOMIS e GRAHAM, 2008; SANTOS et al., 2015) e, conseqüentemente, seu uso tem sido limitado (ALVARENGA et al., 2005; SQUIRES, 2009).

Técnicas de criopreservação de espermatozoides bem-sucedidas têm importância significativa tanto para equinos como outras espécies animais. O congelamento de sêmen tem importância em casos de infertilidade humana, para lidar com as conseqüências adversas na fertilidade de outras doenças que ameaçam a vida, para a conservação das espécies e para a pecuária (WATSON, 2000).

Desta forma, pesquisas são indispensáveis para aprimorar tal biotecnologia de forma a melhorar as taxas de fertilização e permitir a criopreservação de sêmen de garanhões considerados “maus congeladores”. Alvarenga et al. (2016) mencionaram um progresso significativo na última década na criopreservação de sêmen na espécie equina devido desenvolvimento de novos procedimentos, como técnicas de inseminação artificial e técnicas de seleção espermática; alternativas de diluentes com melhor capacidade crioprotetora; aliada a novas abordagens laboratoriais disponíveis para avaliação seminal.

Objetivando reduzir os danos ocasionados pelo processo de criopreservação, estudos relacionados ao uso de substâncias com efeitos crioprotetores se fazem necessárias com intuito de permitir a sobrevivência dos espermatozoides (SQUIRES et al., 2004; OSÓRIO et al., 2008; ALVARENGA et al., 2016) devido uma melhor proteção dos mesmos (AMANN e PICKETT, 1987; OSÓRIO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013). Neste contexto, o uso de antioxidantes nos diluentes de preparação, manutenção e criopreservação em diferentes espécies e processos de criopreservação deve ser investigado (WATSON, 2000; OLIVEIRA et al., 2013; YIMER et al., 2016) devido aos benefícios proporcionados ao espermatozoide, possibilitando ao mesmo suportar mudanças físicas e bioquímicas e desafios enfrentados no decorrer da criopreservação.

Na espécie equina, a suplementação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) ao meio diluente de sêmen é sugerida (ANDRADE, 2013; TIRAPELLE, 2013; SAMPAIO et al.; 2015; SILVA-JUNIOR et al., 2016; YIMER et al., 2016; AGOSTINHO et al., 2017; SILVA et al., 2017) e justificada pelos resultados obtidos em outras espécies (KAEOKET et al., 2010; CHANAPIWAT et al., 2012; NASIRI et al., 2012; TOWHIDI e PARKS, 2012; ABDI-MENEMAR et al., 2015; KAKA et al., 2015a; 2015b; SILVA et al., 2017).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de ácido docosahexaenóico (DHA) e ácido eicosanóico (EPA) em meio diluente específico para a espécie sobre a viabilidade espermática de garanhões da Raça Crioula no processo de criopreservação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Raça Crioula

A raça Crioula se origina nos equinos Andaluz e Jacas espanhóis, vindos da Península Ibérica (ABCCC, 2017a) para a América do Sul no século XVI, através dos conquistadores de tais terras (AFFONSO et al., 2002). Nos quatro longos séculos que se seguiram estes animais se disseminaram, passando por uma seleção natural, onde sobreviveram os mais fortes e resistentes. No século XIX, fazendeiros do sul do continente americano começaram a se conscientizar da importância e da qualidade dos cavalos que habitavam suas terras e deram início à preservação dos mesmos (AFFONSO et al., 2002; ABCCC, 2017a; FERREIRA e FERREIRA, 2017), contribuindo para a formação da raça Crioula

A partir do século XX, a raça ganhou notoriedade mundial, quando a seleção técnica exaltou o seu valor e comprovou suas virtudes. No Brasil, em 1932, criadores de equinos do Rio Grande do Sul fundaram a Associação de Criadores de Cavalos Crioulos – ACCC, posteriormente denominada ABCCC (AFFONSO et al., 2002; ABCCC, 2017b), com intuito de preservar e difundir o cavalo Crioulo no país (ABCCC, 2017a).

Na tentativa de integrar todas as entidades no sul do continente americano, associações de criadores de cavalo Crioulo do Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e Chile fundaram a Federação Interamericana de Criadores de Cavalos Crioulos – FICCC, no ano de 1944 (ABCCC, 2017b). A literatura menciona o estabelecimento do *standard* da raça em 1959, com uniformização e unificação dos Crioulos em seu território de origem posteriormente à encontros ao longo da década de 1950.

O cavalo Crioulo pode ser caracterizado como um cavalo típico, de medidas medianas, dócil, de boa estrutura e aprumos, equilibrado como deve ser todo o bom cavalo de sela (FERREIRA e FERREIRA, 2017). Segundo os autores, o intercâmbio genético entre países constituintes da FICCC possibilitou alcançar um cavalo ideal, que habita o sonho de todos os criadores.

A ABCCC conta com uma lista de modalidades oficiais, regulamentadas para os cavalos Crioulos, as quais estão incluídas Campereada, Crioulaço, Paleteada, Paleteada Internacional, Rédeas, Movimiento a La Rienda, Enduro, Marcha de Resistência, Freio Jovem, Freio do Proprietário, Freio de Ouro e Morfologia (ABCCC, 2017b).

Atualmente, um número superior à 400 mil animais compreende os exemplares registrados distribuídos em todo o território brasileiro. Segundo estudo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo (Esalq/USP), a raça Crioula movimentada anualmente na economia R\$ 1,28 bilhão e gera cerca de 240 mil empregos diretos e indiretos no país (LIMA, 2012). Além disso, só no último ano, houve um crescimento de mais de 20% em número de eventos (mais de 1 mil realizados) e acima de 40% em comercialização de animais (ABCCC, 2018).

O crescimento da criação de equinos da raça Crioula é evidente e se deve, em parte, ao desenvolvimento e utilização de biotecnologias de reprodução, onde o desenvolvimento de técnicas adequadas para a preservação e armazenamento de sêmen devido seus amplos benefícios proporcionados é de extrema importância.

2.2 O espermatozoide

O espermatozoide, descrito pela primeira vez em 1677 por Anthony Van Leeuwenhoek (FAWCETT, 1975; KREMER, 1979), é caracterizado como uma célula altamente diferenciada e especializada em armazenamento e transporte de material genético (AURICH, 2005). Muitos dos mecanismos celulares e moleculares do mesmo ainda não foram descritos, devido suas características bioquímicas e biofísicas tão refinadas (VARNER e JOHNSON, 2011).

Espermatozoides viáveis e não viáveis, além de secreções das glândulas sexuais acessórias do macho, constituem o sêmen. Nos mamíferos, a célula espermática se constitui de uma cabeça, uma peça intermediária, uma peça principal e uma peça final, e é toda coberta pela membrana plasmática (FAWCETT, 1975).

A cabeça contém um núcleo com o material genético masculino que será transferido ao oócito e o acrossoma que possui as enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração no oócito no decorrer da fertilização (JOHNSON et al., 1997). No interior do núcleo se encontra a cromatina condensada, formada pelo ácido desoxirribonucleico (DNA) e proteínas (VARNER e JOHNSON, 2011), e a protamina, a principal proteína associada ao DNA espermático que parece ter correlação com a qualidade seminal (PARADOWSKA-DOGAN et al., 2014). Além disso, a cabeça contém estruturas do citoesqueleto e uma pequena quantidade de citoplasma (EDDY, 2006).

Formado a partir do complexo de Golgi, o acrossoma recobre a porção anterior do núcleo e é envolvido por uma bicamada lipídica que separa o DNA do citoplasma circundante. Tal cobertura pode ser dividida em membrana acrossomal interna, em contato com a membrana nuclear, e membrana acrossomal externa, se fundindo ao lado interno da membrana plasmática (FLESCH e GADELLA, 2000; VARNER e JOHNSON, 2011).

No interior do acrossoma, localiza-se uma variedade de receptores de proteínas e enzimas hidrolíticas, as quais têm importância na adesão e penetração da zona pelúcida e interações do espermatozoide com o oolema (BUFFONE et al., 2008).

Enquanto a principal função da cabeça do espermatozoide é a liberação de material genético ao oócito, a função da cauda é propiciar a motilidade necessária à célula para viabilizar a fertilização no trato reprodutivo da fêmea (FAWCETT, 1975). A cauda ou flagelo é formada por quatro segmentos, o colo que conecta a cabeça do espermatozoide à cauda propriamente dita, a peça intermediária, a peça principal e a peça final (JOHNSON et al., 1997; AMANN e GRAHAM, 2011) e, segundo Eddy (2006), suas principais estruturas são o axonema ou filamento axial, a bainha de mitocôndrias e a bainha fibrosa externa.

O axonema é a única estrutura que se estende por todo o flagelo, sendo constituído de dois microtúbulos centrais circundados por nove microtúbulos duplos (VARNER E JOHNSON, 2011), os quais são compostos pelas proteínas α e β tubulina e dineína, que possui atividade ATPase (EDDY, 2006).

Na peça intermediária a bainha de mitocôndrias disposta em forma de espiral dupla, contendo enzimas e cofatores necessários para a produção de ATP (AMANN e GRAHAM, 2011), é responsável pela produção da energia necessária para a motilidade celular (GADELLA ET AL., 2001). Ainda nesta porção do flagelo estão presentes nove fibras densas com estrutura fibrosa resistente à queratina, as quais diminuem gradualmente na peça principal e não estão presentes na peça final (AMANN e GRAHAM, 2011).

A bainha fibrosa, constituinte da peça principal (EDDY, 2006), fornece suporte estrutural rígido e elasticidade à cauda, além de ter papel importante para uma variedade de eventos de sinalização celular e metabólicos (VARNER E JOHNSON, 2011).

Toda a superfície do espermatozoide, incluindo cabeça e flagelo, é envolta pela membrana plasmática, a qual sofre diferenças regionais em virtude de suas distintas funções fisiológicas (GADELLA ET AL., 2001; AURICH, 2005; AMANN e GRAHAM, 2011).

O modelo estrutural básico da membrana plasmática é constituído por lipídeos e proteínas organizadas em uma bicamada lipídica. As proteínas, encontradas entremeadas aos fosfolipídeos (AMANN e PICKETT, 1987), podem ser consideradas integrantes,

fundamentais para a estrutura da membrana, ou periféricas, que estão associadas a membrana e podem ser facilmente removidas (AMANN e GRAHAM, 2011).

Variações consideráveis na composição lipídica são encontradas entre diferentes espécies, entre diferentes machos de uma espécie e até entre diferentes ejaculados de um mesmo macho (GADELLA ET AL., 2001). Segundo os mencionados autores, os lipídios encontrados na membrana plasmática dos espermatozoides da espécie equina são fosfolipídeos (57%), colesterol (37%) e glicolipídeos (6%). O colesterol preenche os espaços entre as cadeias de ácidos graxos de fosfolipídios, e na superfície da membrana se localizam os glicolipídios (PARKS e GRAHAM, 1992).

A relação da composição entre colesterol e fosfolipídeos, a natureza dos fosfolipídios e a temperatura são fatores que interferem na fluidez da membrana (AMANN e GRAHAM, 2011). A capacidade da membrana de suportar o estresse, como choque a frio, está relacionada à sua estrutura, em geral, quanto maior a relação colesterol: fosfolipídio na membrana maior a resistência frente às mudanças de temperatura (AMANN e PICKETT, 1987; PARKS e GRAHAM, 1992). Diferenças na composição lipídica da membrana plasmática são sugeridas como fator-chave na congelabilidade de diferentes espermatozoides na espécie equina devido os mesmos possuem menor relação colesterol:fosfolipídio, sendo mais sensíveis ao choque térmico durante a redução de temperatura (PARKS e LYNCH, 1992).

A membrana plasmática tem permeabilidade seletiva e atua como uma barreira, sua integridade exerce papel fundamental na sobrevivência do espermatozoide e na manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAM, 1992; AURICH, 2005).

2.3 A criopreservação de sêmen equino

A criopreservação é a tecnologia pelo qual células ou tecidos biológicos são preservados abaixo do ponto de congelamento da água, com objetivo de preservar a composição e viabilidade dos mesmos por tempo indeterminado (PEGG, 2002). Além disso, benefícios do uso de sêmen congelado na espécie equina incluem o favorecimento da difusão de material genético, possibilitando maximização do potencial genético de ganhões superiores; oportuniza a redução de riscos e custos com aquisição e transporte de animais e viabilização da inseminação artificial em momento ideal na tentativa de maximizar a fertilidade; permite o uso de sêmen de ganhões impossibilitados de uso com fins

reprodutivos, temporariamente ou permanentemente, como em casos de carreira atlética, doenças ou óbito; e ainda proporciona o controle de doenças (AMANN e PICKETT, 1987; SQUIRES, 2009; GIBB e AITKEN, 2016; YIMER et al., 2016). A possibilidade de um banco de recursos genéticos com intuito de preservar a biodiversidade de espécies ameaçadas ou linhas transgênicas valiosas também é favorecida através do emprego da biotecnologia relatada (BAILEY et al., 2000).

Além disso, o sucesso de outras biotecnologias pode ser relacionado à criopreservação de sêmen (YIMER et al., 2016). Já foi relatada a possibilidade de descongelamento, divisão e recongelamento de doses de sêmen previamente criopreservadas, o que permite conservação de limitados espermatozoides e oportunidade de otimização na produção de embriões através da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (SIELHORST et al., 2016).

Em equinos, a primeira gestação oriunda de espermatozoides congelados foi relatada em 1957 por Barker e Gandier. Nos últimos anos a criopreservação tem apresentado grandes avanços com um incremento na qualidade e fertilidade após o processamento, embora o uso de sêmen congelado em larga escala possa ser considerado limitado na indústria equina por razões técnicas e restrições impostas por associações de registro.

No decorrer de tal processo os espermatozoides são submetidos a condições desfavoráveis e, conseqüentemente, redução da capacidade fertilizante por alterações estruturais e funcionais (PARKS e GRAHAN, 1992).

Diferenças quantitativas entre espécies determinam a fertilidade do sêmen criopreservado (OLDENHOF et al., 2017). Com exceção da espécie bovina, na maioria das espécies de mamíferos o potencial fertilizante é claramente reduzido quando utilizado sêmen congelado (HOLT, 2000; WATSON, 2000). Na espécie equina, é relatada uma variabilidade da qualidade do sêmen congelado (AMANN e PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996; KATILA et al., 2001; ALVARENGA et al., 2005; HOFFMANN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; ALVARENGA e CARMO, 2016), além de uma grande parcela de garanhões apresentar características de sêmen pós-descongelamento inadequadas para o uso, e ainda diferenças entre ejaculados de um mesmo garanhão.

Diversas características dos espermatozoides são consideradas importantes e devem ser mantidas após a criopreservação (HOLT, 2000). O sucesso desta biotecnologia é dependente de uma série complexa de interações. Para manutenção da capacidade de fertilização do espermatozoide, após congelamento e descongelamento, é necessário que o mesmo retenha ao menos quatro atributos gerais, como metabolismo para produção de energia; motilidade progressiva; enzimas acrossomais íntegras, consideradas de extrema

importância para penetração do ovócito; e proteínas na membrana plasmática fundamentais para a sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea e para fixação à membrana plasmática do óvulo na fertilização (AMANN e PICKETT, 1987).

Na criopreservação de sêmen são reconhecidas distintas etapas de processamento, as quais possuem relação à estrutura da membrana e ao metabolismo celular (HAMMERSTEDT et al., 1990). São elas extensão e resfriamento, adição de crioprotetores e embalagem, congelamento, armazenamento, e descongelamento e inseminação.

O conhecimento das tensões às quais as células são expostas no decorrer da criopreservação, bem como das propriedades celulares que se correlacionam com a congelabilidade, podem auxiliar na projeção racional de protocolos personalizados de congelamento para indivíduos (HOFFMANN et al., 2011) objetivando manutenção do potencial fertilizante das células espermáticas e consequente sucesso da reprodução assistida.

2.3.1 Danos causados ao sêmen equino pela criopreservação

Mudanças na natureza biofísica são evidentes em temperaturas inferiores a 37°C (AMANN e PICKETT, 1987). No decorrer do processo de criopreservação lesões nos espermatozoides podem ser prejudiciais às suas funções subseqüentes ou serem letais (WATSON, 2000), podendo ser caracterizadas como diretas, quando estruturas celulares são afetadas, ou indiretas quando é alterada a funcionalidade celular (HOLT, 2000).

Como o processo de criopreservação envolve congelamento e descongelamento, tanto o choque frio quanto o choque quente são incluídos como tensões potenciais a serem consideradas (WATSON, 1995). A capacidade dos espermatozoides permanecerem viáveis à -196°C não é o problema da criopreservação, os danos são resultantes de resfriamento e aquecimento através uma zona intermédia de temperaturas, cerca de -15 a -60 ° C (AMANN E PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996).

Fontes de estresse potencialmente prejudiciais às células espermáticas são encontradas no protocolo de criopreservação, como mudança de temperatura, estresses osmóticos e tóxicos que podem ser apresentados devido à exposição a concentrações molares de crioprotetores, e formação e dissolução de gelo no ambiente extracelular (WATSON, 2000). Diferenças entre espécies na sensibilidade de seus espermatozoides no decorrer de tal processo são amplamente atribuíveis à variações de composição das membranas plasmáticas de tais células (PARKS e LYNCH, 1992; BAILEY et al., 2000).

Após ejaculação e no decorrer do processamento do sêmen, uma variedade de fatores pode danificar a membrana plasmática do espermatozoide (AURICH, 2005). Alterações estruturais e funcionais desta estrutura no decorrer do congelamento e descongelamento são responsáveis pela posterior redução da fertilidade do sêmen. Durante o processo, as membranas podem sofrer rearranjos, formando pontos vulneráveis e, conseqüentemente, é induzida excessiva permeabilidade ou até rompimento da mesma (AMANN e GRAHAM, 2011).

Quando a temperatura é reduzida, especialmente na faixa de temperatura de 19°C a 5°C, lipídios e proteínas de membrana passam de um estado fluido (livre movimentação dos componentes) para um estado gel (AMANN e PICKETT, 1987; PARKS e GRAHAM, 1992; HOLT, 2000), pelo fato das cadeias de ácidos graxos se converterem de uma apresentação aleatória para uma organização de forma paralela e rígida (HAMMERSTEDT et al., 1990), o que induz instabilidade na membrana podendo provocar danos irreversíveis (AMANN e PICKETT, 1987). Tais mudanças na permeabilidade da membrana resultam em alterações funcionais e metabólicas, o que prejudica a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides (AMANN e GRAHAM, 2011).

No descongelamento os eventos citados são parcialmente revertidos (AMANN e PICKETT, 1987), conseqüentemente ao aumento da temperatura, a membrana plasmática é submetida a redistribuições estruturais envolvendo lipídios e proteínas (HOLT, 2000).

Profunda alteração na permeabilidade da membrana e morte celular também ocorre em função da produção de ATP. No organismo, de acordo com a temperatura corporal tal produção está relacionada à concentrações de cálcio, sódio, potássio e magnésio dentro dos limites apropriados, à medida que a temperatura é reduzida a regulação de tais concentrações é afetada e sérias conseqüências à função celular são provocadas (AMANN e PICKETT, 1987).

Outros componentes da membrana também podem ser alterados pelo estresse térmico, como elementos do citoesqueleto da célula (WATSON, 2000). A despolimerização da actina F do citoesqueleto permite a aproximação da membrana plasmática com a membrana externa do acrossoma, promovendo a exocitose do conteúdo acrossomal (HOLT, 2000). O resfriamento ou a criopreservação podem contribuir para a fusão desorganizada destas membranas (WATSON, 2000).

A principal causa de lesão por congelamento das células é a ruptura da membrana plasmática, que ocorre devido a esforços térmicos, mecânicos, químicos e osmóticos impostos

à membrana (PARKS e GRAHAN, 1992), os quais provocam principalmente a desidratação celular ou formação de gelo intracelular (MERYMAN, 1966).

Quando uma suspensão de espermatozoides é resfriada abaixo de 0° C, cristais de gelo extracelulares são formados (GIBB E AITKEN, 2016), resultando em um aumento na concentração de sais no fluido extracelular (AMANN e PICKETT, 1987). O aumento do gradiente osmótico através da membrana plasmática faz com que a água intracelular se difunda para fora da célula, desidratando tanto a célula quanto a membrana plasmática (PARKS e GRAHAN, 1992).

Se a taxa de resfriamento é lenta a alta concentração de sais intracelulares pode danificar os espermatozoides e se a taxa de resfriamento é rápida pode haver formação de cristais intracelulares (AMANN e PICKETT, 1987). A taxa de resfriamento deve ser lenta o suficiente para permitir que a água deixe as células por osmose impedindo formação de gelo intracelular (WATSON, 2000).

Nos espermatozoides, efeitos deletérios no decorrer do processo de criopreservação também ocorrem em virtude da ocorrência de danos oxidativos (YIMER et al., 2016) pela produção excessiva das espécies reativas de oxigênio (EROs) (BAUMBER et al., 2000; BILODEAU et al., 2000; BALL et al., 2001). De acordo com os autores, espermatozoides e plasma seminal possuem enzimas e antioxidantes objetivando evitar possíveis danos celulares ocasionados por um desequilíbrio entre a geração e a degradação de EROs no tecido que, segundo Michael et al. (2009) em baixas concentrações atuam como mediadores das funções normais dos espermatozoides.

Além dos efeitos letais diretos de congelamento e descongelamento, os espermatozoides que sobrevivem ao processo de congelamento e descongelamento são “menos adequados” do que os espermatozoides recém-ejaculados (PARKS e GRAHAN, 1992). Segundo os autores, tais observações são consistentes com a noção de que as membranas de tais espermatozoides são mais frágeis que as membranas de espermatozoides frescos.

2.3.2 Diluentes e crioprotetores utilizados na criopreservação de sêmen equino

O prolongamento da vida dos espermatozoides é conferido pelos diluentes, estabilizando os sistemas enzimáticos e mantendo a integridade de membrana. Na composição

dos meios utilizados para diluição do sêmen para criopreservação são incluídas substâncias com propriedades de proteção e nutrição (HOLT, 2000; OLDENHOF et al., 2017).

Em geral, de acordo com Pickett e Amann (1987), o diluente deve possuir características como pressão osmótica compatível, adequado equilíbrio de minerais em sua composição e combinação apropriada de nutrientes, substâncias com capacidade de neutralizar produtos tóxicos produzidos pelo espermatozoide, constituintes que confirmam proteção às células espermáticas das variações de temperatura (choque térmico), possibilitar estabilização do sistema enzimático, e promover manutenção da integridade da membrana.

Possivelmente as variações na composição lipídica da membrana plasmática encontradas entre diferentes espécies, entre diferentes machos de uma espécie e até entre diferentes ejaculados de um mesmo macho (GADELLA et al., 2001) expliquem os diferentes resultados de um mesmo diluente. Foi descrito que a não existência de um diluente ideal para toda espécie equina é devida à variabilidade nos resultados (PICKETT e AMANN, 1987).

Dos muitos meios diluentes desenvolvidos para processamento de sêmen equino, a maioria inclui leite ou gema de ovo, além de crioprotetores e outros aditivos. Embora leite e a gema de ovo possuam efeitos benéficos, problemas podem advir por tais substâncias biológicas serem compostas por uma variedade de moléculas diferentes que podem diferir de acordo com partida e fabricação (AURICH, 2005). Segundo Holt (2000), há uma necessidade de encontrar substitutos dadas as necessidades atuais de controle de doenças e, portanto, evitar substâncias biologicamente derivadas nos meios diluentes.

Com intuito de reduzir os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e se mostraram como bons crioprotetores. O uso de agentes crioprotetores no processo de criopreservação se faz necessário com intuito de permitir a sobrevivência dos espermatozoides (SQUIRES et al., 2004) por propiciar uma melhor proteção aos mesmos (AMANN e PICKETT, 1987; OSÓRIO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013).

Para que um crioprotetor seja eficiente, são requeridas propriedades como um baixo peso molecular, ótima solubilidade em água e mínima toxicidade (MEDEIROS et al., 2002; ALVARENGA et al., 2005). A toxicidade dos agentes crioprotetores limita sua concentração e eficácia (AMANN e PICKETT, 1987), um dos fatores importantes que afetam o sucesso da criopreservação.

As substâncias crioprotetoras podem ser classificadas como penetrantes ou intracelulares e não penetrantes ou extracelulares. Segundo Hammerstedt et al. (1990), ambos

podem causar uma desidratação celular devido indução osmótica de saída, mas diferem na capacidade de entrar na célula e residir no citoplasma e nas membranas.

Na maioria das espécies, incluindo a espécie equina, o glicerol é o crioprotetor penetrante utilizado como eletivo em espermatozoides (AMANN e PICKETT, 1987; ALVARENGA et al., 2005; OLDENHOF et al., 2017). O efeito de tal crioprotetor na membrana plasmática ocorre por meio de uma ligação direta aos fosfolipídios, reduzindo sua fluidez e interferindo na permeabilidade celular (PARKS e GRAHAM, 1992).

No entanto, a baixa fertilidade do sêmen congelado de alguns garanhões é relacionada a presença do glicerol nos meios de congelamento (SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA e CARMO, 2016; ALVARENGA et al., 2016). A sensibilidade aos efeitos prejudiciais, segundo Alvarenga et al. (2005), é relatada de acordo com a espécie. Além das diferenças na capacidade de resistir à exposição ao glicerol entre espécies, parece haver uma interação das mesmas com as taxas de congelamento usadas e o grau de crioproteção conferida (HOLT, 2000; SQUIRES et al., 2004). Adicionalmente, Alvarenga e Carmo (2016), mencionam que o glicerol pode reduzir as taxas de fertilidade do sêmen congelado mesmo quando a motilidade e a viabilidade de espermatozoides são preservadas.

Neste contexto, crioprotetores menos tóxicos que o glicerol estão sendo estudados como alternativas durante o congelamento de sêmen. Em estudos realizados com sêmen equino foram relatadas evidências sobre a proteção das amidas no processo de criopreservação, capacidade ainda mais notável quando o sêmen processado provém de garanhões que congelam mal quando utilizado glicerol (MEDEIROS et al., 2002; SQUIRES et al., 2004). As amidas podem induzir um menor dano osmótico ao penetrar na membrana plasmática mais rapidamente, devido ao menor peso molecular quando comparadas ao glicerol (SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005).

A crioproteção da célula espermática através do uso de amidas, como a dimetilformamida (MEDEIROS et al., 2002; SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005; OLDENHOF et al., 2017), inclusive em garanhões da raça crioula (OLIVEIRA et al., 2013), a metilformamida (MEDEIROS et al., 2002; SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005) e a dimetilacetamida (MEDEIROS et al., 2002; ALVARENGA et al., 2005), foi demonstrada com eficácia em relação ao glicerol. Além da obtenção de boas taxas de criopreservação, maior fertilidade foi observada utilizando um crioprotetor do grupo amida, comparado ao glicerol com dimetilformamida, em alguns estudos na espécie equina (MEDEIROS, 2003; MOFFET et al., 2003).

Alvarenga et al. (2005) demonstraram que o uso de diluidores com dimetilformamida e metilformamida em ganhões com sêmen de congelabilidade satisfatória pode não resultar em aumento na motilidade dos espermatozoides pós-descongelamento, mas aumenta a fertilidade deste sêmen. Em contrapartida, em ganhões cujo sêmen tem baixa resistência à criopreservação, o uso de tais diluentes proporciona uma melhora significativa na motilidade e fertilidade dos espermatozoides quando comparado à diluentes com glicerol.

Os crioprotetores não penetrantes também podem ser utilizados com intuito de minimizar o estresse osmótico no decorrer do resfriamento. Representados por moléculas de alto peso molecular, como alguns açúcares, lipídios e lipoproteínas da gema de ovo, e proteínas do leite, eles protegem a célula através de mecanismos osmóticos, sem necessidade de penetração (AMANN e PICKETT, 1987). Segundo os autores, tais crioprotetores atuam aumentando a osmolaridade do meio extracelular, ou seja, tornam o ambiente hipertônico promovendo a desidratação pela saída de água do interior da célula espermática de modo a reduzir a formação de cristais de gelo intracelular no processo.

Açúcares são adicionados, frequentemente, aos meios usados para o congelamento de oócitos, embriões ou espermatozoides em diversas espécies (SQUIRES ET AL., 2004), mas na espécie equina pesquisas e resultados são limitados. De Oliveira et al. (2017) relataram a adição de glicose e ureia possibilitando redução do teor de glicerol para uma concentração de 1,25%, com sucesso no congelamento de sêmen equino. Recentemente, o uso de sacarose em combinação com albumina sérica bovina foi avaliada na criopreservação de sêmen de ganhões, alternativa aos agentes crioprotetores permeáveis de membrana amplamente utilizados, como o glicerol (CONSUEGRA et al., 2018).

Na literatura, a escolha do crioprotetor parece ter sido uma questão de tentativa e erro devido não existir uma explicação completa e satisfatória para a ação dos crioprotetores (HOLT, 2000). Segundo Gibb e Aitken (2016), a variabilidade inerente de produtos biologicamente derivados, sejam de origem animal ou vegetal, significa que resultados consistentes não podem ser garantidos e, por isso, é importante a identificação de alternativas crioprotetoras quimicamente definidas e não penetrantes. Além disso, uma melhor proteção ao espermatozoide é observada quanto utilizada uma combinação de crioprotetores em comparação com o uso de agentes únicos (ALVARENGA et al., 2016).

2.3.3 Antioxidantes na criopreservação de sêmen equino

Assim como em uma variedade de tipos celulares (BALL, 2008), o equilíbrio entre EROs e a desintoxicação dos mesmos é mencionada como um importante fator de sobrevivência e funcionalidade dos espermatozoides (BAUMBER et al., 2000; SIKKA, 2004), exercendo influência direta sobre a fertilidade (BILODEAU et al., 2000; BALL et al., 2001).

Os antioxidantes, em geral, são substâncias com objetivo de suprimir ou retardar a velocidade da oxidação através da inibição da produção de EROs e/ou de seus efeitos (SIKKA, 2004).

Neste contexto, é importante um entendimento de como os antioxidantes podem auxiliar nos mecanismos relacionados ao estresse oxidativo das células espermáticas, compreendendo seus mecanismos de ação (SIKKA, 2004). Um sistema de defesa antioxidante é apresentado pelos espermatozoides ou no plasma seminal, o qual inclui agentes antioxidantes enzimáticos (catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase) e não enzimáticos (como α -tocoferol, ácido ascórbico e glutathione) (BILODEAU et al., 2000; BALL, 2008).

Na criopreservação dos espermatozoides propriamente dita, o estresse oxidativo promovido por tais EROs exerce mudanças físicas e químicas na célula, há perda da dinâmica existente entre as substâncias pró e antioxidativas, prejudicando o sistema de defesa antioxidante (BAUMBER et al., 2000; YIMER et al., 2016). Além de alterações na membrana plasmática, o estresse oxidativo também afeta proteínas e o DNA espermático (SIKKA, 2004).

Em equinos, a geração de EROs in vitro foi demonstrada em trabalho realizado por Ball et al. (2001). As células espermáticas danificadas, não viáveis ou morfologicamente anormais geram quantidades significativamente maiores de EROs que os espermatozoides vivos ou morfologicamente normais, e que estas células irão acelerar o desaparecimento da população restante, contribuindo para a redução da fertilidade ou problemas relacionados à preservação do sêmen. Aitken et al. (2015) descreveram um mecanismo potencial para este fenômeno através da descoberta de uma enzima geradora de EROs em espermatozoides associado à criopreservação de espermatozoides equinos.

Além disso, é relatado um compartilhamento de características entre espermatozoides criopreservados e capacitados (BAILEY et al., 2000; CEROLINI et al., 2001). A capacitação

espermática torna tais células com capacidade de fertilização e com suscetibilidade à degeneração da membrana e espontânea reações acrossomais caso não fertilizem. Desta forma, os efeitos deletérios em virtude do estresse oxidativo acarretam uma redução na longevidade de espermatozoides criopreservados afetando diretamente a capacidade fertilizante do mesmo (BAILEY et al., 2000; BALL, 2008).

No processo de criopreservação o sêmen é exposto ao oxigênio, luz e vários outros fatores que podem levar a produção excessiva das EROs (SILVA et al., 2013). Além disso, suscetibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo é relatada como decorrente das altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) na membrana plasmática (BAILEY et al., 2000; BAUMBER et al., 2002; SIKKA, 2004; AURICH, 2005; MICHAEL et al., 2009); pela remoção do plasma seminal e consequente retirada da proteção antioxidante celular em seu processamento (BAUMBER et al., 2000; BALL, 2008); e pela redução de níveis de antioxidantes nos espermatozoides pelo próprio processo de criopreservação (BILODEAU et al., 2000).

Com intuito de reduzir os danos oxidativos causados pelo desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, substâncias com capacidade antioxidante têm sido adicionadas aos diluentes de preparação, manutenção e criopreservação em diferentes espécies e processos de criopreservação. Diluentes de sêmen tradicionais não possuem componentes específicos que agem no estresse oxidativo ou protegem os espermatozoides de danos oxidativos (YIMER et al., 2016). De acordo com os autores, esta suplementação com antioxidantes é benéfica ao espermatozoide, possibilitando-o suportar mudanças físicas e bioquímicas e desafios enfrentados durante a criopreservação. Neste contexto, estudos tem sido realizados com machos de variadas espécies (AURICH et al., 1997; MALDJIAN et al., 2005; MICHAEL et al., 2009), incluindo a espécie equina (AGUERO et al., 1995; BALL et al., 2001; MORILLO-RODRÍGUEZ et al., 2012; GIBB et al., 2013; MARTINS et al., 2018).

Na espécie equina, a suplementação de antioxidantes ao meio diluente de sêmen apresentou efeitos benéficos. Resultado positivo com a adição de α -tocoferol ao sêmen equino criopreservado foi demonstrado por Aguero et al. (1995) e Franco et al. (2013). Efeitos protetores sobre a integridade da membrana espermática no sêmen do garanhão foram demonstrados com o uso de outro antioxidante, o ácido ascórbico (AURICH et al., 1997).

Estudos realizados por Ball (2008), relataram a inexistência de benefícios com a adição de antioxidantes ao sêmen equino criopreservado sobre alguns parâmetros avaliados no pós-descongelamento. Entretanto, melhor qualidade seminal e maiores taxas de fertilidade

foram encontradas pelo referido autor quando houve suplementação oral de algumas substâncias antioxidantes, demonstrando ação das mesmas.

Posteriormente, outras substâncias antioxidantes foram relatadas na criopreservação de sêmen equino. O butil-hidroxitolueno, segundo Morillo-Rodríguez et al. (2012), não demonstrou efeitos positivos. Em contraste, a quercetina adicionada ao meio diluente para sexagem e criopreservação de espermatozoides, melhorou a motilidade e melhorou acentuadamente a capacidade de ligação da zona pelúcida dos mesmos (GIBB et al., 2013). Neste mesmo estudo, efeitos não diferiram quando utilizada catalase, cisteína ou nenhum tratamento antioxidante. A lactoferrina, possivelmente devido sua ação antioxidante, melhorou a funcionalidade de membrana dos espermatozoides (MARTINS et al., 2018).

A suplementação de PUFA's ao diluente de congelamento também é sugerida devido ao fato de possivelmente aumentarem a resistência das membranas ao evitar a formação de cristais de gelo (MERYMAN, 1966) e haver perda de PUFA's em função da peroxidação lipídica (CEROLINI et al., 2001), além de melhorarem a viabilidade e motilidade espermática (ROOKE et al., 2001). Resultados benéficos foram descritos com a adição de óleo de peixe em suínos (KAEOKET et al., 2010; CHANAPIWAT et al., 2012) e ovinos (SAMADIAN et al., 2010; ABDI-MENEMAR et al., 2015), e em bovinos a suplementação com fonte de PUFA n-3 e α -tocoferol (NASIRI et al., 2012; TOWHIDI e PARKS, 2012) ou somente com DHA (KAKA et al., 2015a,b).

Em garanhões, alguns estudos conduzidos (TIRAPELLE, 2013; SAMPAIO et al.; 2015; SILVA-JUNIOR et al., 2016) para investigar os possíveis efeitos protetores de PUFA's no diluente utilizado para criopreservação de espermatozoides apresentaram resultados inconsistentes. Contudo, a adição de óleo de peixe provocou a melhora da motilidade total e motilidade progressiva (ANDRADE, 2013) e melhor eficiência da funcionalidade da membrana espermática (AGOSTINHO et al., 2017) após descongelamento.

Recentemente, Silva et al. (2017), em estudo pioneiro avaliaram o efeito da adição de DHA exógeno em espermatozoides da espécie equina. Resultados positivos foram demonstrados no sêmen resfriado, mas DHA não apresentou benefícios quando adicionado antes do congelamento ou após o descongelamento e, segundo os autores, investigações futuras são necessárias.

Dentre as várias pesquisas realizadas com o objetivo de melhorar os resultados obtidos através do uso de sêmen congelado/descongelado, é evidenciada a importância do uso de antioxidantes para reduzir as crioinjúrias (SILVA e GUERRA, 2011; GIBB et al., 2013; SILVA et al., 2013; YIMER et al., 2016; SILVA et al., 2017; MARTINS et al., 2018)

decorrentes do estresse oxidativo (MICHAEL et al., 2009). Os resultados são contraditórios em virtude da concentração e do tipo de antioxidante utilizado, bem como seus mecanismos de ação. Desta forma, se faz necessário o aprofundamento sobre as interações das substâncias com as células espermáticas e suas possíveis consequências (SILVA et al., 2017).

2.4 Métodos de avaliação do sêmen

Para determinação do desempenho reprodutivo do garanhão é de extrema importância a avaliação do sêmen, auxiliando a prever a fertilidade potencial de um determinado reprodutor e avaliar com maior acurácia se o sêmen é capaz de ser submetido a procedimentos como resfriamento e congelamento (VARNER, 2008).

Para obtenção de informações confiáveis e precisas é fundamental o uso combinado de diferentes testes de avaliação das injúrias espermáticas (SANTOS et al., 2015). Nenhum teste isolado pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen (ARRUDA et al., 2011) devido ao fato de que a capacidade de fertilização do espermatozoide e posterior desenvolvimento embrionário decorre da integridade e funcionalidade das diferentes estruturas celulares (GRAHAM et al., 1990).

A avaliação de motilidade, concentração e morfologia espermática são os parâmetros clássicos na avaliação de amostras de sêmen (ARRUDA et al., 2007). Entretanto, uma avaliação da estrutura interna da célula espermática tem importância. Os autores mencionados descrevem a avaliação seminal envolvendo uma grande diversidade de técnicas, como análise de imagem por computador; uso de sondas fluorescentes para a avaliação das estruturas espermáticas, testes hiposmóticos, avaliação de proteínas do plasma seminal, entre outras (ARRUDA et al., 2011).

2.4.1 Motilidade espermática

Devido ao fato de ser facilmente acessível e rápido de executar, a motilidade é o parâmetro mais comumente utilizado na avaliação seminal (KATILA, 2001). Usualmente, estimativa da motilidade espermática é obtida através de análise entre lâmina e lamínula, sob uso de microscopia óptica (ARRUDA et al., 2007). Entretanto, é relatada uma imprecisão de

tal análise pela subjetiva que envolve (AMMAN E PICKETT, 1987) e variabilidade entre técnicos e padrões para a avaliação (ARRUDA et al., 2007; VARNER, 2008).

Sistemas que utilizam análise computadorizada de imagem têm sido desenvolvidos e empregados com intuito de obter uma técnica com maior repetibilidade, tanto para motilidade quanto para morfometria. Arruda (2000) caracteriza tal método de avaliação dos espermatozoides como preciso e acurado, com alto grau de objetividade.

Para a avaliação da motilidade propriamente dita, o software reconhece as células e desenha para cada espermatozoide uma sequência completa do movimento para reconstituir sua trajetória, classificando-o conforme os padrões definidos como: móvel não progressivo (motilidade local, MC), linear lento (motilidade lenta, ML), linear rápido (motilidade rápida, MR) e imóvel. Outras características de movimento espermático são calculadas, fornecendo parâmetros de motilidade como: porcentagem de móveis (motilidade total, MT), porcentagem de móveis progressivos (motilidade progressiva, MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimentos (BCF), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Em conjunto, tais valores são utilizados para diferenciar os padrões do movimento espermático (MORTIMER, 2000).

2.4.2 Integridade funcional da membrana – Teste hiposmótico

A membrana plasmática atua como uma barreira e sua integridade exerce papel fundamental na sobrevivência do espermatozoide e na manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAM, 1992; AURICH, 2005).

A avaliação da integridade funcional da membrana é realizada através do teste hiposmótico (HOST), um teste complementar simples, prático e confiável (ARRUDA et al., 2011). O teste é caracterizado como importante na avaliação seminal *in vitro* após criopreservação (MELO et al., 2005) devido ao fato dos possíveis efeitos deletérios que tal processo pode ocasionar sobre a membrana (AMMAN e PICKETT, 1987, PARKS e LYNCH, 1992, HOLT, 2000; WATSON, 2000; AMANN e GRAHAM, 2011).

A habilidade de permitir o transporte seletivo de moléculas é uma das propriedades da membrana celular, quando os espermatozoides são expostos a uma solução hiposmótica, a água entra na célula na tentativa da célula em alcançar o equilíbrio osmótico e,

consequentemente, o volume espermático aumentará provocando uma turgidez na membrana plasmática (MALMGREN, 1997). A cauda é particularmente susceptível a esta condição hiposmótica (VAZQUEZ et al., 1997), e a capacidade de flexão do flagelo indica que o transporte de água através da membrana ocorre normalmente e que esta se encontra íntegra e com funcionalidade (FUSE et al., 1993).

2.4.3 Integridade física das membranas – Sondas fluorescentes

A funcionalidade de organelas dos espermatozoides ou seus compartimentos tem sido analisada por procedimentos específicos de coloração, conhecidos como sondas fluorescentes (ARRUDA et al., 2007). De acordo com Aurich (2005), muitas tentativas para avaliação de membranas baseiam-se na ideia de que a membrana plasmática intacta iria evitar que certos corantes entrem no citoplasma da célula espermática.

As técnicas que utilizam tais métodos vêm ganhando importância pela característica de possibilitar marcar estruturas específicas das células e detectar a integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara e criteriosa (CELEGHINI, 2005; ARRUDA et al., 2011).

Para avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozoide várias sondas fluorescentes têm sido utilizadas. O uso associado ou separado de Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e o Iodeto de Propídio (PI) é descrito na avaliação de tal estrutura em várias espécies, incluindo a equina (GARNER et al., 1986). O CFDA é um fluoróforo penetrante na membrana, que consegue transpor a membrana intacta, e o PI é um fluorocromo que se liga ao DNA celular e penetra somente através de células com a membrana plasmática lesada (ARRUDA, 2000; CELEGHINI, 2005). Como resultado deste método, os espermatozoides com membrana íntegra apresentam fluorescência verde (CFDA), e os espermatozoides com lesão na membrana apresentam o núcleo vermelho fluorescente (PI).

Técnicas para marcação do acrossoma têm sido utilizadas para permitir a detecção de defeitos. Para a avaliação da integridade do acrossoma, há duas classes de sondas fluorescentes: as que detectam elementos intracelulares associados ao acrossoma, como as lecitinas e os anticorpos contra antígenos internos ao acrossoma; e as que podem ser utilizadas em células não permeabilizadas, que incluem a clortetraciclina (CTC) e os anticorpos contra antígenos acrossomais externos (CROSS et al., 1986). Segundo os autores, as lecitinas são

empregadas com maior sucesso pela acessibilidade aos agentes e capacidade de ligação a glicoconjugados da matriz acrossomal ou à membrana acrossomal externa.

Dentre as lecitinas utilizadas para a determinação de integridade de acrossoma estão as aglutininas, e para a visualização do acrossoma em microscopia de epifluorescência, estas são conjugadas a fluoresceínas, como o Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (CELEGHINI et al., 2007). Aglutinina *Ricinus communis* (RCA) foi a primeira lecitina conjugada ao FITC para a análise do status acrossomal, mas em razão de sua toxicidade e os cuidados requeridos em seu manuseio, essa lecitina foi substituída convenientemente pelas aglutinina de *Peanut agglutinin* (PNA) e aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) (SILVA e GADELLA, 2006). Entretanto, há preferência pelo uso do conjugado FITC-PNA (THOMAS et al., 1997) pelo fato de alguns componentes da gema de ovo apresentam certa afinidade com a aglutinina PSA, dificultando a análise espermática (NAGY et al., 20013).

A análise do potencial de membrana de mitocôndrias também pode ser realizada através de sondas fluorescentes. Os componentes com sensibilidade a tal avaliação mais comumente utilizados são as rodaminas e carbocianinas (GRAVANCE et al., 2000). De acordo com autores, a Rodamina 123 (R123) é um fluorocromo capaz de corar mitocôndrias que identifica apenas uma população de células com função mitocondrial, não sendo capaz de diferenciar mitocôndrias com potencial de membrana alto ou baixo.

O iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1), tem sido utilizado como uma medida sensível para detectar mudanças no potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides em várias espécies (CELEGHINI et al., 2007). Diferentes potenciais de membrana identificados por JC-1 são identificados por alteração da coloração do verde para o laranja, com o aumento do potencial de membrana. O JC-1 possui baixa toxicidade, boa solubilidade e características fluorescentes apropriadas para detecção por sistema de filtros, comumente usada em microscopia de epifluorescência (SMILEY et al., 1991).

Possibilidade de avaliação concomitante de vários segmentos da mesma célula espermática é permitido pelo uso de associações de sondas fluorescentes, sendo possível obter resultados promissores com as mesmas (ARRUDA et al., 2007). Para avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática, acrossomal e o potencial mitocondrial de uma mesma célula espermática, a associação PI, FITC-PSA e JC-1 foi considerada a melhor (CELEGHINI et al., 2007).

3. ARTIGO

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO NA THERIOGENOLOGY

ADIÇÃO DE ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) E ÁCIDO EICOSANÓICO (EPA) NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO

Lidia Dutra Farias^{a,b*}, Verônica La Cruz Bueno^{a,b}, Carolina Litchina Brasil^c, Karina Lemos Goularte^c, Rafael Gianella Mondadori^d, Sandra Fiala Rechsteiner^{a,b}.

^a Programa de Pós-graduação em Medicina Animal: Equinos, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

^b HISTOREP – Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia, UFPel, Pelotas, RS, Brasil

^c Faculdade de Veterinária, UFPel, Pelotas, RS, Brasil

^d Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia, UFPel, Pelotas, RS, Brasil

*lidiadfarias@hotmail.com

* Corresponding author: Lidia Dutra Farias

Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil

Tel.: 55 53 999520769.

E-mail address: lidiadfarias@hotmail.com

RESUMO

Em equinos é descrita uma variabilidade na qualidade do sêmen congelado, relacionada principalmente a variações consideráveis na composição da membrana plasmática do espermatozoide. Neste contexto, estudos investigam alternativas para aumentar a fertilidade ao se usar sêmen congelado, e a adição de ácidos graxos polinsaturados ao diluente de congelamento é sugerida. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de ácidos graxos poli-insaturados: ácido eicosanóico e ácido docosahexaenóico, em meio diluente específico para a espécie sobre as características do espermatozoide pós-descongelamento. Foi utilizado sêmen de quatro garanhões (quatro ejaculados por garanhão) da raça Crioula. O sêmen foi diluído em diluente de congelamento comercial a base de gema

de ovo, glicerol e dimetilformamida (Botu-Crio©) ajustando a concentração para 200×10^6 espermatozoides viáveis/mL (grupo controle) e, na sequência, os demais tratamentos: adição de ácido docosahexaenóico nas doses $25\mu\text{m}$ e $50\mu\text{m}$ /mL e ácido eicosanóico nas doses $25\mu\text{m}$ e $50\mu\text{m}$ /mL.. Após o descongelamento foram realizadas análises de cinética espermática no sistema de Análise Computadorizada para Avaliação Espermática, das seguintes variáveis: motilidade total, motilidade progressiva, motilidade rápida, motilidade lenta, motilidade local, velocidade de trajeto, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, amplitude do deslocamento lateral da cabeça, frequência de batimentos, retilinearidade e linearidade; e avaliação da integridade física através do uso de sondas fluorescentes, e funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico. Não houve diferença variáveis avaliadas. Este é o primeiro estudo que descreve a adição de ácido eicosanóico ao sêmen equino. Concluiu-se a adição de ácido docosahexaenóico e eicosanóico nas concentrações testadas não alterou as variáveis avaliadas no sêmen de garanhões da raça Crioula.

Palavras-chave: ácidos graxos poli-insaturados, criopreservação, sêmen, espermatozoides, fertilidade, garanhão.

1. Introdução

O desenvolvimento e a utilização de biotecnologias na reprodução têm permitido um incremento nacional e mundial na criação de equinos. Neste contexto, a criopreservação de espermatozoides está incluída e, embora apresente amplos benefícios [1, 2, 3], tem seu uso limitado devido às razões técnicas e restrições impostas por associações de registro.

Na espécie equina, é descrita variabilidade na qualidade do sêmen congelado [1, 4, 5] relacionada a variações consideráveis na composição da membrana plasmática do espermatozoide [6, 7] que, além de encontradas entre diferentes espécies, são relatadas entre diferentes machos de uma espécie e até entre diferentes ejaculados de um mesmo macho [8].

Um dos fatores relacionados à queda da viabilidade espermática após criopreservação nos equinos é a alta predisposição destas células a sofrerem danos oxidativos em virtude da elevação dos níveis de EROs [3, 9, 10, 11] que, além de alterações na membrana plasmática, também afeta proteínas e o DNA espermático [12].

A suscetibilidade ao estresse oxidativo é descrita como decorrente de concentrações excessivas de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) na membrana plasmática [7, 12, 13, 14, 15], especialmente da família ômega-3 (n-3) [16]. Entretanto, os PUFAs são considerados potentes antioxidantes [3] e são diretamente relacionados a muitos processos reprodutivos, tanto em machos como em fêmeas [17], suas concentrações no espermatozoide estão

relacionadas à qualidade do sêmen e função espermática [16, 18], eles conferem a fluidez da membrana plasmática [17, 19] necessária para atingir fertilização.

Além disso, no decorrer do processo de criopreservação, ocorre perda de PUFA's das membranas em virtude da peroxidação lipídica [20].

Neste contexto, a adição de PUFA's ao diluente de congelamento em animais é sugerida devido possivelmente aumentarem a resistência das membranas ao evitar a formação de cristais de gelo [21], repor as PUFA's da membrana perdidas pela peroxidação lipídica [3, 20] e melhorar a viabilidade e motilidade espermática [18, 22].

A suplementação do meio diluente com PUFA's apresenta resultados controversos em diversas espécies. Em suínos [23], bovinos [24, 25, 26, 27] e caprinos [28], inicialmente não foram demonstrados efeitos positivos na qualidade dos espermatozoides pós descongelamento, porém, outros estudos demonstraram melhora nos parâmetros espermáticos em suínos [29, 30], ovinos [16, 31] e bovinos [32, 33, 34, 35, 36].

Na espécie equina, os resultados também são controversos. Alguns estudos conduzidos para investigar os possíveis efeitos protetores de PUFA's no diluente utilizado para criopreservação de espermatozoides apresentaram resultados que não justificavam seu uso [22, 37, 38]. Entretanto, a adição de óleo de peixe no diluente de congelamento resultou em melhor motilidade total e motilidade progressiva [39] e melhor eficiência da funcionalidade da membrana espermática [40] após descongelamento. A adição do ácido docosahexaenóico (DHA) ao diluente de sêmen equino melhorou a qualidade seminal durante o resfriamento, porém sem resultados positivos no congelamento [41].

Considerando as justificativas expostas, os resultados controversos disponíveis na literatura e o fato do ácido eicosanóico (EPA) nunca ter sido avaliado como aditivo no congelamento de sêmen equino, este estudo foi conduzido para avaliar o efeito da adição de diferentes níveis de DHA e EPA em meio diluente específico para a espécie nas características do espermatozoide pós-descongelamento.

2. Material e métodos

Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de ética e experimentação animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas sob número 2740/2018.

2.1 *Garanhões e coleta de sêmen*

O sêmen foi coletado de quatro garanhões da raça Crioula, clinicamente saudáveis e com histórico de fertilidade conhecido com idade entre seis a 16 anos e peso entre 450 a 500 Kg, alimentados diariamente com concentrado e feno de alfafa, com acesso à água e sal mineral. Os animais estavam alojados em propriedade rural no município de Pinheiro Machado estado do Rio Grande do Sul, Brasil(latitude 31° 61' 01" S, longitude 53° 45' 67" W) e permaneceram soltos em piquetes de campo nativo (espécies como *Paspalum notatum*, *P. dilatatum* e *Trifolium polymorphum* segundo Boldrini [42]) durante o dia e estabulados à noite.

As coletas de sêmen (quatro ejaculados por garanhão, n=16) foram realizadas com uso de vagina artificial modelo Botucatu lubrificada e pré-aquecida (42 e 45°C), utilizando como manequim uma égua em estro devidamente contida. O ejaculado foi coletado em saco plástico estéril em copo coletor, protegido da luz e de variações de temperatura.

2.2 *Diluição seminal e análises iniciais*

Imediatamente após a coleta foi realizada uma análise macroscópica do ejaculado, sendo avaliados o aspecto, coloração e odor, e o volume total. Após foi realizado o descarte da fração gelatinosa da amostra com auxílio de filtro específico e/ou pipeta Pasteur, sendo então definido o volume livre de gel do ejaculado e realizada a diluição inicial na proporção 1:1 em diluente comercial a base de leite desnatado (Botu-Sêmen® Biotech Botucatu) pré-aquecido à 37°C.

Na sequência um técnico treinado analisou a motilidade (0-100%) e vigor (0-5) em microscópio óptico (aumento 200x) com a amostra em lâmina e lamínula pré-aquecidas à 37°C. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer e microscópio óptico sob aumento 200x, utilizando o fator de diluição uma parte de sêmen para 19 partes de água destilada (50 µl de sêmen diluído em 950 µl de água destilada). A morfologia espermática foi avaliada em esfregaço corado com kit panóptico® (Laborclin), sendo contadas 200 células espermáticas por lâmina em aumento de 1000x.

2.3 *Criopreservação e tratamentos*

Foram criopreservadas amostras com motilidade total $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 , além de concentração espermática média de 100-200 x 10⁶/mL e espermatozoides normais $\geq 70\%$ (CBRA, 2013). A técnica de criopreservação utilizada foi a descrita descrita por Papa et al. [43], resumidamente um total de 200 x 10⁹ espermatozoides viáveis foi distribuído em tubos

falcon (50 mL) e centrifugados a 600 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e *pellet* formado foi ressuspensionado em um diluente de congelamento comercial a base de gema de ovo, glicerol e dimetilformamida (Botu-Crio® Biotech Botucatu) previamente aquecido a 37°C, de modo a ajustar a concentração para 200 x 10⁶ espermatozoides viáveis/mL.

Os tratamentos foram obtidos através da adição de uma solução estoque de 30 mM de DHA (Sigma D-2534) e EPA (Sigma E-2011) em etanol, ao sêmen diluído em Botu-Crio, visando obter as seguintes concentrações finais: CON: controle (sem adição de PUFA); DHA25: 25µM DHA/mL; EPA25: 25µM EPA/mL; DHA50: 50µM DHA/mL; e EPA50: 50µM EPA/mL.

As amostras foram então envasadas em palhetas de 0,5 ml e refrigeradas a 5°C por 20 minutos em refrigerador comercial, expostas ao vapor de nitrogênio (três a seis cm acima do nível do nitrogênio) durante 20 minutos, sendo finalmente imersas no nitrogênio líquido.

2.4 *Descongelamento, avaliação cinética espermática e da membrana plasmática*

O descongelamento das amostras foi realizado utilizando banho-maria a 37°C por 30 segundos.

As variáveis de cinética espermática foram avaliadas no sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis computadorizado, Tiefenbach, Alemanha, AndroVision®), em câmaras apropriadas (Leja Products B.V., Holanda) e pré-aquecidas a 37°C. As análises incluíram as variáveis Motilidade Total (%) (MT); Motilidade Progressiva (MP, %); Motilidade Rápida (MR, %), Motilidade Lenta (ML, %), Motilidade Local (MC, %) Velocidade de Trajeto (VAP, µm/s); Velocidade Progressiva (VSL, µm/s); Velocidade Curvilínea (VCL, µm/s); Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, µm); Frequência de Batimentos (BCF, Hz); Retilinearidade (STR, VSL/VAP, %); e Linearidade (LIN, VSL/VCL, %), conforme os parâmetros do equipamento.

Para a análise da integridade física da membrana plasmática (IMP) foi utilizada a combinação de sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína, permeável às células com membrana íntegra, e iodeto de propídio, permeável às células com membrana lesada, de acordo com a técnica descrita por Garner et al. [44]. Uma amostra de 400 µl de sêmen foi incubada com solução de iodeto de propídio (PI) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), a 37°C por oito minutos. A análise da amostra foi realizada em microscopia de epifluorescência (aumento 1000x, sob imersão), sendo avaliados um total de 100

espermatozoides por amostra e considerados íntegros aqueles que apresentaram coloração verde (CFDA) e lesados os com coloração vermelha (PI).

A funcionalidade de membrana foi avaliada com o auxílio do teste hiposmótico (HOST), onde 200 μ L de água destilada foi adicionado a 100 μ L de sêmen, incubado a 37°C por oito minutos e analisado em microscópio de contraste de fase em aumento 400x. Foram avaliados 100 espermatozoides por amostra, sendo considerados íntegros os espermatozoides que apresentavam a cauda enrolada [45]. A morfologia espermática foi avaliada conforme já descrito.

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA através do Programa Statistix 90. Após teste de normalidade por Shapiro-Wilk, somente a variável STR apresentou distribuição normal. Para obter distribuição normal, as variáveis VSL, VAP, ALH, BCF, foram transformadas por arco seno e as variáveis VCL e LIN foram transformadas por log. Foi considerado nível de significância $P < 0,05$.

3. Resultados

Os resultados encontrados para cada cinética espermática, integridade de membrana e teste hiposmótico, de acordo com o tratamento estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1

Valores médios e desvios padrão das variáveis de cinética espermática pós-descongelamento de sêmen equino congelado em diferentes tratamentos: controle e as diferentes concentrações de ácido docosahexaenóico (25 μ m/mL (DHA25) e 50 μ m/mL (DHA50)) e ácido eicosanóico (25 μ m/mL (EPA25) e 50 μ m/mL (EPA50)).

	CON	DHA25	EPA25	DHA50	EPA50
MT (%)	36,42 \pm 10,87	32,15 \pm 11,60	32,38 \pm 12,33	29,17 \pm 12,84	31,66 \pm 17,78
MP (%)	21,69 \pm 9,21	18,87 \pm 9,03	18,60 \pm 9,99	16,05 \pm 10,91	17,78 \pm 10,27
MR (%)	1,27 \pm 1,42	1,06 \pm 1,68	0,97 \pm 1,33	0,53 \pm 0,80	0,64 \pm 0,81
ML (%)	19,98 \pm 8,46	17,34 \pm 7,83	16,47 \pm 8,36	15,17 \pm 9,84	16,67 \pm 9,31
MC (%)	0,43 \pm 0,26	0,50 \pm 0,37	0,53 \pm 0,54	0,34 \pm 0,38	0,50 \pm 0,53
VAP (μ m/s)	26,21 \pm 6,74	25,63 \pm 8,72	24,04 \pm 7,02	22,63 \pm 10,24	25,12 \pm 9,19
VSL (μ m/s)	21,80 \pm 5,87	21,50 \pm 8,05	19,87 \pm 5,90	18,60 \pm 9,21	21,01 \pm 8,10
VCL (μ m/s)	57,71 \pm 15,56	53,67 \pm 17,30	51,80 \pm 15,79	50,01 \pm 19,94	53,11 \pm 19,53
ALH (μ m)	0,67 \pm 0,18	0,62 \pm 0,18	0,61 \pm 0,16	0,59 \pm 0,16	0,61 \pm 0,20
BCF (Hz)	9,56 \pm 3,38	8,71 \pm 3,35	8,70 \pm 3,12	8,66 \pm 4,26	8,54 \pm 3,42

STR (%)	0,68 ± 0,05	0,66 ± 0,05	0,67 ± 0,05	0,66 ± 0,06	0,66 ± 0,08
LIN (%)	0,32 ± 0,04	0,31 ± 0,04	0,32 ± 0,03	0,32 ± 0,05	0,32 ± 0,05

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, MR: motilidade rápida, ML: motilidade lenta, MC: motilidade local, VAP: velocidade de trajeto, VSL: velocidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça, BCF: frequência de batimentos, STR: retilinearidade, LIN: linearidade.

Tabela 2

Valores médios e desvios padrão das variáveis integridade de membrana e teste hiposmótico pós-descongelamento de sêmen equino congelado em diferentes tratamentos: controle e as diferentes concentrações de ácido docosahexaenóico (25µm/mL (DHA25) e 50µm/mL (DHA50)) e ácido eicosanóico (25µm/mL (EPA25) e 50µm/mL (EPA50)).

	CON	DHA25	EPA25	DHA50	EPA50
IMP (%)	28,38 ± 8,23	22,78 ± 8,85	23,30 ± 7,52	25,27 ± 9,08	21,10 ± 6,98
HOST (%)	25,19 ± 11,31	27,25 ± 9,18	26,27 ± 7,09	23,33 ± 8,47	23,87 ± 8,24

Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$). IMP: integridade física da membrana plasmática, e HOST: integridade funcional da membrana plasmática.

Não foram observadas diferenças entre as variáveis analisadas e os tratamentos.

4. Discussão

Os resultados obtidos neste estudo não mostraram toxicidade na adição de DHA e EPA ao sêmen de garanhão antes do congelamento, mas também não foram demonstrados efeitos em nenhuma das variáveis de qualidade espermática avaliadas, em contraste com resultados descritos em outras espécies. Melhor motilidade pós-descongelamento e integridade acrossomal foram descritos na espécie suína através do uso de diluente de criopreservação suplementado com DHA de óleo de peixe [29, 30]. Em bovinos, aumento da motilidade pós-descongelamento [33, 34, 35, 36], morfologia melhorada, integridade acrossômica e integridade da membrana [34, 35] foram relatados após a adição *in vitro* de DHA ao sêmen antes do congelamento. A adição de óleo de peixe, além de melhorar as características seminais após descongelamento na espécie ovina, resultou em maiores taxas de fertilidade [31] e atenuou declínios de qualidade sazonais [16].

No entanto, há diferenças quanto ao protocolo de criopreservação entre as espécies suína, bovina, ovina e equina, e as membranas espermáticas da espécie em estudo podem ter

maior sensibilidade ao congelamento e descongelamento do que a apresentada pelas demais e, desta forma, DHA e EPA não foram suficientes para promover melhoras na qualidade seminal.

Na espécie equina, corroborando com os resultados obtidos neste estudo, Silva-Junior et al. [38] e Silva et al. [41] não detectaram efeito na adição de DHA ao diluente de criopreservação de sêmen.

Estudos demonstraram melhor motilidade total e motilidade progressiva [39] e melhor eficiência da funcionalidade da membrana espermática [40] após descongelamento quando adicionado óleo de peixe no diluente de congelamento de sêmen de garanhões. Em contraste, a adição de óleo de fígado de bacalhau, rico em PUFAs [22], e de DHA em combinação com vitamina E [37], não foram eficazes em proporcionar maior crioresistência ao sêmen equino, embora não tenha sido demonstrada toxicidade dos mesmos.

A suplementação dietética de DHA na espécie equina resultou em maiores níveis de DHA no sêmen [46] e melhores características seminais no sêmen fresco, resfriado e criopreservado [47, 48]. Pode ser adequado pensar que a duração mais longa de um tratamento dietético pode resultar em uma absorção mais significativa do DHA nas membranas dos espermatozoides.

Além disso, a incorporação de PUFAs à membrana plasmática, apesar de aumentar sua flexibilidade, pode torná-la mais susceptível à peroxidação lipídica, diminuindo a viabilidade espermática [33].

Adicionalmente, uma hipótese é de que a suplementação de PUFAs ao diluente de criopreservação pode melhorar, de forma significativa, as características seminais de ejaculados com pior resistência ao processo de congelamento do que os que congelam bem, uma vez que em suas membranas há concentrações inferiores de lipídios. No presente estudo não havia garanhões, nem ejaculados, com características seminais pós-descongelamento consideradas ruins (motilidade pós descongelamento <20%), segundo Alvarenga et al. [5]. Desta forma, deveria ser investigado um grupo maior de garanhões, com variabilidade de qualidade seminal pós-descongelamento.

É evidente que os PUFAs são substâncias essenciais para a fertilidade masculina, pois proporcionam fluidez adequada à membrana plasmática do espermatozoide [17, 19, 21] e, por isso, é suposto que diminuiriam os danos às membranas plasmáticas durante o congelamento [23]. Existe uma escassez de estudos publicados que adicionaram DHA e EPA na criopreservação de sêmen, especialmente na espécie equina. Além de concentrações diferentes, pode ser necessário um período de incubação para que efeitos positivos decorram

sobre os espermatozoides. Também seria interessante analisar mais amostras de um mesmo tratamento nos diferentes ejaculados, a fim de obter dados mais significativos.

5. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que o presente estudo *in vitro* demonstrou que a adição de DHA e EPA ao diluente de criopreservação nas concentrações testadas não demonstrou efeitos deletérios ao sêmen de garanhões da raça Crioula.

Entretanto, considerando os resultados controversos encontrados, é difícil estabelecer se a adição de PUFA, em particular de DHA e EPA, é um método útil para melhorar a congelabilidade do sêmen equino ou não. Uma possível causa que deve ser considerada para um provável comportamento diferente após adição de PUFA são as diferenças encontradas na composição do sêmen de diferentes espécies. Por tal razão, em investigações futuras podem ser fundamentais avaliação de diferentes períodos e temperaturas de incubação do sêmen equino com lipídeos exógenos, além de diferentes concentrações e realização de quantificação dos lipídeos para constatar se os mesmos foram ou não incorporados à membrana plasmática do espermatozoide. Além disso, estudos *in vivo* podem ser importantes para avaliar a fertilidade do sêmen equino criopreservado, quando adicionado DHA e EPA ao diluente.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

Referências

- [1] AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.7, n.3, p.145-173, 1987.
- [2] SQUIRES, E.L. Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse industry? *Journal of Equine Veterinary Science*, v.29, n.5, p.268-273, 2009.
- [3] YIMER, N., KAKA, A., YUSOFF, R., HARON, A.W. The Roles of Antioxidants and Fatty Acids in Sperm Cryopreservation. *Cryopreservation in Eukaryotes*, IntechOpen, v.7, p.103-120, 2016.
- [4] GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract.*, v.12, p.131-147, 1996.

- [5] 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.
- [6] PARKS, J.E., LYNCH, D.V. Lipid Composition and Thermotropic Phase Behavior of Boar, Bull, Stallion, and Rooster Sperm Membranes. *Cryobiology*, v.29, p.255-266, 1992.
- [7] BAILEY, J.L, BILODEAU, J., CORMIER, N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *Journal of Andrology*, v.21, n.1, p.1-7, 2000.
- [8] GADELLA, B.M., RATHI, R., BROUWERS, J.F.H.M., STOUT, T.A.E., COLENBRANDER, B. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, Amsterdam, v.68, n.3-4, p.249- 265, 2001.
- [9] 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, n.6, p.895-902, 2000.
- [10] BILODEAU, J., CHATTERJEE, S., SIRARD, M., GAGNON, C. Levels of Antioxidant Defenses Are Decreased in Bovine Spermatozoa After a Cycle of Freezing and Thawing. *Molecular reproduction and development*, v.55, p.282-288, 2000.
- [11] BALL, B.A., MEDINA, V., GRAVANCE, C.G., BAUMBER, I. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.56, p.577-569, 2001.
- [12] SIKKA, S.C. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *Journal of Andrology*, v.25, n.1, p.5-18, 2004.
- [13] BAUMBER, J., VO, A., SABEUR, K., BALL, B. A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.57, n.3, p.1025-1033, 2002.
- [14] AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.89, n.1-4, p.65-75, 2005.
- [15] MICHAEL, A.J., ALEXOPOULOS, C., PONTIKI, E.A., HADJIPAVLOU-LITINA, D.J., SARATSI, P., VERVERIDIS, H.N., BOSCO, C.M. Effect of antioxidant supplementation in sêmen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.112, p.119-135, 2009.

- [16] SAMADIAN, F., TOWHIDI, A., REZAYAZDI, K., BAHREINI, M. Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. *Animal*, v.4, p.2017-2022, 2010.
- [17] WATHES, D.C., ABAYASEKARA, D.R.E., AITKEN, R.J. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction. *Biology of Reproduction*, v.77, p.190-201, 2007.
- [18] ROOKE, J.A., SHAO, C., SPEAKE, B.K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of sêmen. *Reproduction*, v.121, p.315-322, 2011.
- [19] FLESCHE, F. M., GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v.1469, n.3, p.197-235, 2000.
- [20] 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.
- [21] MERYMAN, H.T. Review of biological freezing. In: MERYMAN, H.T. *Cryobiology*. Academic Press, London, p.1-114.
- [22] SAMPAIO, B.F.B., SILVA-JUNIOR, E.R., BORTOLETTO, L.P., SILVA, E.V.D., ZÚCCARI, C.E.S.N. Óleo de fígado de bacalhau ou colesterol solúvel em água no diluidor de congelação aumentam a crioresistência do espermatozoide equino? *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhededor, Goiânia, v.11, n.21, p.1432-1443, 2015.
- [23] MALDJIAN, A., PIZZI, F., GLIOZZI, T., CEROLINI, S., PENNY, P., NOBLE, R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar sêmen. *Theriogenology*, v.63, p.411-421, 2005.
- [24] AMBROZIO, K.S., LEONEL, E.C.R., SCHREDER, G.G., SILVA, V.B., SILVA, E.V.C., ZÚCCARI, C.E.S.N. Adição do ácido docosahexaenóico ao diluidor de congelação do sêmen bovino. *Anais do 38º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, Florianópolis, p.1-3, 2011.
- [25] ABAVISANI, A., ARSHAMI, J., NASERIAN, A.A., KANDELOUSI, M.A.S., AZIZADEH, Quality of bovine chilled or frozen-thawed semen after addition of omega-3 fatty acids supplementation to extender. *International Journal of Fertility and Sterility*, v.7, n.3, p. 161-168, 2013.
- [26] KANDELOUSI, M.S., ARSHAMI, J., NASERIAN, A., ABAVISANI, A. The effects of addition of omega-3, 6, 9 fatty acids on the quality of bovine chilled and frozen-thawed sperm. *Open Veterinary Journal*, v.3, p.47-52, 2013

- [27] KIERNAN, M., FAHEY, A.G., FAIR, S. The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reproduction, Fertility and Development*, v.25, p.947-954, 2013.
- [28] YIMER, N., NORAI SYAH, A.H., ROSNINA, Y., WAHID, H., SARSAIFI, K., HAFIZAL, A.M. Comparison of Cryopreservative Effect of Different Levels of Omega-3 Egg-Yolk in Citrate Extender on the Quality of Goat Spermatozoa. *Pakistan Veterinary Journal*, v.34, n.3, 347-350, 2014.
- [29] KAEOKET, K., SANG-URAIL, P., THAMNIYOM, A., CHANAPIWAT, P., TECHAKUMPHU, M. Effect of Docosahexaenoic Acid on Quality of Cryopreserved Boar Semen in Different Breeds. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.458-463, 2010.
- [30] CHANAPIWAT, P., KAEOKET, K., TUMMARUK P. Improvement of the frozen boar semen quality by docosahexaenoic acid (DHA) and L-cysteine supplementation. *African Journal of Biotechnology*, v.11, n.15, p.3697-3703, 2012.
- [31] ABDI-BENEMARA, H., JAFAROGHLI, M., KHALILI, B., ZAMIRID, M.J., EZAZIE, H., SHADPARVARF, A.A. Effects of DHA supplementation of the extender containing egg yolk and α -tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*, v.130, p.166–170, 2015.
- [32] NASIRI, A.H., TOWHIDI, A., ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrologia*, v.44, p.550-555, 2012.
- [33] TOWHIDI, A., PARKS, J.E. Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. *Journal Assisted Reproduction and Genetics*, v.29, p.1051-1056, 2012.
- [34] KAKA, A., WAHID, H., ROSNINA, Y., YIMER, N., KHUMRAN, A.M., BEHAN, A.A., KAKA, U., EBRAHIMI, M. Effect of docosahexanoic acid (DHA) on quality of frozen-thawed bull semen using Tris extender. 6th Pan Commonwealth Veterinary Conference of the CVA and 27th Veterinary Association Malaysia, p.191-193, 2015a.
- [35] KAKA, A., WAHID, H., ROSNINA, Y., YIMER, N., KHUMRAN, A.M., SARSAIFI, K., BEHAN, A.A., KAKA, U., MEMON, A.A., EBRAHIMI, M. Effect of docosahexanoic acid on quality of frozen–thawed bull semen in BioXcell extender. *Reproduction, Fertility and Development*, v.29, n.3, p.490-495, 2015b.
- [36] NASIRI, A.H., TOWHIDI, A., ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrologia*, v.44, p.550-555, 2012.

- [37] TIRAPELLE, C. Effect of DHA supplementation during stallion semen cryopreservation on sperm characteristics. 2013. 73f. Monografia (Conclusão de curso em Medicina Veterinária) – Università Degli Studi di Padova, 2013.
- [38] 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, n.4, p.370-384, 2011.
- [39] ANDRADE, V.A.A. Utilização de óleo de peixe na criopreservação de semen equino. 2013. 47f. Monografia (Conclusão de curso em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2013.
- [40] AGOSTINHO, R.F.A., ANDRADE, V.A.A., CAIADO, R.P.S., BARRETO, M.A.P., CAIADO, J.R.C., SHIMODA, E., SILVA, J.F.S. The addition of the salmon oil in the freezing of equine semen. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v.18, n.4, p.604-609, 2017.
- [41] SILVA, D.M., HOLDEN, S.A., LYONS, A., SOUZA, J.C., FAIR, S. In vitro addition of docosahexaenoic acid improves the quality of cooled but not frozen-thawed stallion semen. *Reproduction, Fertility and Development*, v.29, n.10, p.2021-2027, 2017.
- [42] BOLDRINI, I.I. A flora dos campos do Rio Grande do Sul. In: PILLAR, V.P., MÜLLER, S.C., CASTILHOS, Z.M.S., JACQUES, A.V.Á. (Ed.), *Campos sulinos - conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2009. cap.04, p.63-77, 403 p
- [43] PAPA, F.O., MELO, C.M., FIORATTI, E.G., DELL'AQUA-JUNIOR, J.A., ZAHN, F.S., ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.293-301 2008.
- [44] GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A., PACE, .M. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. *Biology of Reproduction*, v.34, n.1, p.127-138, 1986.
- [45] LAGARES M.A., PETZOLDT, R., SIEME, H. et al. Preservação do sêmen fresco equino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. *Arquivo Faculdade Veterinária UFRGS*, v.26, p.29-42, 1998.
- [46] BRINSKO, S.P., VARNER, D.D., LOVE, C.C., BLANCHARD, T.L., DAY, B.C. WILSON, M.E. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology*, v.63, p.1519-1527, 2005.

[47] ELHORDOY, D.M., CAZALES, N., COSTA, G., ESTÉVEZ, J. Effect of dietary supplementation with DHA on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.319-327, 2008.

[48] RODRIGUES, P.G., MOURA, R.S., ROCHA, L.G.P., BOTTINO, M.P., NICHI, M., MACULAN, R., BERTECHINI, A.G., SOUZA, J.C. Dietary polyunsaturated fatty acid supplementation improves the quality of stallion cryopreserved semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.54, p.18-23, 2017.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo *in vitro* demonstrou que a adição de DHA e EPA ao diluente de criopreservação, nas concentrações testadas, não demonstrou efeitos deletérios ao sêmen de garanhões da raça Crioula.

Entretanto, os estudos publicados relatando os efeitos da adição destas substâncias na criopreservação de sêmen são escassos e controversos, especialmente na espécie equina. Investigações futuras são importantes e devem ser realizadas com intuito de demonstrar se a adição de PUFAs, em particular de DHA e EPA, é um método útil para melhorar a congelabilidade do sêmen equino ou não. Desta forma, avaliação de diferentes períodos e temperaturas de incubação do sêmen equino com lipídeos exógenos, além de diferentes concentrações e realização de quantificação dos lipídeos para constatar se os mesmos foram ou não incorporados à membrana plasmática do espermatozoide podem auxiliar em tal questão. Adicionalmente, estudos *in vivo* podem ser importantes para avaliar a fertilidade do sêmen equino criopreservado, quando adicionado DHA e EPA ao diluente.

REFERÊNCIAS

- ABCCC. **Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Crioulo** (2017a). Disponível em <http://www.cavalocrioulo.org.br/studbook/cavalo_crioulo> Acesso: dezembro de 2017.
- ABCCC. **Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Crioulo** (2017b). Disponível em <<http://www.cavalocrioulo.org.br/noticias/detalhes/134729/nota-de-repudio-declaracoes-do-ex-presidente-lula>> Acesso: dezembro de 2017.
- ABCCC. **Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Crioulo** (2018). Disponível em <<http://www.cavalocrioulo.org.br/noticias/detalhes/134729/nota-de-repudio-declaracoes-do-ex-presidente-lula>> Acesso: março de 2018.
- ABDI-BENEMARA, H., JAFAROGHLI, M., KHALILI, B., ZAMIRID, M.J., EZAZIE, H., SHADPARVARF, A.A. Effects of DHA supplementation of the extender containing egg yolk and α -tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research**, v.130, p.166–170, 2015.
- AFFONSO, A., CORRÊA, S., MARINO, S. **Cavalo Crioulo 70 anos de raça**. 1ª Ed. Martins Livreiro Ed., Porto Alegre, p.150, 2002.
- AGOSTINHO, R.F.A., ANDRADE, V.A.A., CAIADO, R.P.S., BARRETO, M.A.P., CAIADO, J.R.C., SHIMODA, E., SILVA, J.F.S. The addition of the salmon oil in the freezing of equine semen. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.18, n.4, p.604-609, 2017.
- AGUERO, A., MIRAGAYA, M.H., MORA, N.G., CHAVES, M.G., NEILD, D.M., BECONI, M.T. Effect of vitamin E addition on equine sperm preservation. **Comptes Rendus Biologies**, v.13, p.343-356, 1995.
- AITKEN, J.B., NAUMOVSKY, N., CURRY, B., GRUPEN, C.G., GIBB, Z., AITKEN, J. Characterization of an L-amino acid oxidase in equine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.92, n.5, p.1-29, 2015.
- ALVARENGA, M.A., CARMO, M.T. **Biotecnologia em reprodução: o que há de novo para o veterinário à campo?** (2016) Disponível em <<http://www.abraveq.com.br/wpcontent/uploads/2016/08/BIOTECNOLOGIA-EM-REPRODU%C3%87%C3%83OQ%C3%9CIN-A-O-QUE-H%C3%81-DE-NOVO-PARA-O-VETERIN%C3%81RIO-DE-CAMPO.pdf>> Acesso: junho de 2017.

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., PAPA, F.O., NETO, C.R. Advances in Stallion Semen Cryopreservation. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.32, n.3, p.521-530, 2016.

AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O. et al. (Ed.), **Equine Reproduction**. 2 ed.Oxford: Wiley-Blackwell Publishing Ltda., 2011. cap.102, p.1053-1084, 3310 p.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p.145-173, 1987.

ANDRADE, V.A.A. **Utilização de óleo de peixe na criopreservação de semen equino**. 2013. 47f. Monografia (Conclusão de curso em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2013.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R.P., ANDRADE, A.F.C., PERES, K.R., RAPHAEL, C.F., NASCIMENTO, J., CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.8-16, 2007.

ARRUDA, R.P., CELEGHINI, E.C.C., ALONSO, M.A., CARVALHO, H.F., OLIVEIRA, L.Z., NASCIMENTO, J., SILVA, D.F., AFFONSO, F.J., LEMES, K.M., JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.19, p.145-151, 2011.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2000.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, n.1-4, p.65-75, 2005.

AURICH, J.E., SCHÖNHERR, U., HOPPE, H., AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.185-192, 1997.

BAILEY, J.L, BILODEAU, J., CORMIER, N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. **Journal of Andrology**, v.21, n.1, 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., MEDINA, V., GRAVANCE, C.G., BAUMBER, I. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrossomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.56, p.577-569, 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, n.6, p.895-902, 2000.

BAUMBER, J., VO, A., SABEUR, K., BALL, B. A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, n.3, p.1025-1033, 2002.

BILODEAU, J., CHATTERJEE, S., SIRARD, M., GAGNON, C. Levels of Antioxidant Defenses Are Decreased in Bovine Spermatozoa After a Cycle of Freezing and Thawing. **Molecular reproduction and development**, v.55, p.282-288, 2000.

BUFFONE, M.G., FOSTER, J.A., GERTON, G.L. The role of the acrosomal matrix in fertilization. **The International Journal of Developmental Biology**, v.52, p.511-522, 2008.

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. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E.C.C., ARRUDA, R.P., ANDRADE, A.F., NASCIMENTO, J., RAPHAEL, C.F. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, n.5, p.479-488, 2007.

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.

CHANAPIWAT, P., KAEOKET, K., TUMMARUK P. Improvement of the frozen boar semen quality by docosahexaenoic acid (DHA) and L-cysteine supplementation. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.15, p.3697-3703, 2012.

- CONSUEGRA, C., CRESPO, F., BOTTREL, M., ORTIZ, I., DORADO, J., DIAZ-JIMENEZ, M., PEREIRA, B., HIDALGO, M. Stallion sperm freezing with sucrose extenders: a strategy to avoid permeable cryoprotectants. **Animal Reproduction Science**, v.191, p.85-91, 2018.
- CROSS, N. L., MORALES, P., OVERSTREET, J.W., HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**, v.15, n.3, p.213-226, 1986.
- DE OLIVEIRA, R. A., BUDIK, S., AURICH, C. Influence of partial or total replacement of glycerol by alternative cryoprotectants in Ghent freezing extender on post-thaw sperm quality in stallions. *Reproduction in Domestic Animals*, v.52, p.1-7, 2017.
- EDDY, E. M. The Spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The Physiology of Reproduction**. 3 ed. Amsterdam: Elsevier Inc., 2006. cap.1, v.1, p.3-38, 3230 p.
- FAWCETT, D.W. The Mammalian Spermatozoon. **Developmental Biology**, v.44, p.394-436, 1975.
- FERREIRA, M., FERREIRA, J. Texto de abertura histórica do Freio de Ouro 2017. **Anuário ABCCC 2017**, p.383, 2017.
- FLESCHE, F. M., GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1469, n.3, p.197-235, 2000.
- Food and Agriculture Organization** – FAO United Nations (2016). Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>>. Acesso: janeiro de 2018.
- FRANCO, J.S.V., CHAVEIRO, A., GÓIS, A., SILVA, F.M.S. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, n.10, p.787-93, 2013.
- FUSE, H., OHTA, S., SAKAMOTO, M, KAZANA, T., KATAYAMA, T. Hypoosmotic swelling test with a medium of distilled water. **Archives of Andrology**, v.30, n.2, p.111-6, 1993.
- GADELLA, B.M., RATHI, R., BROUWERS, J.F.H.M., STOUT, T.A.E., COLENBRANDER, B. Capacitation and acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.68, n.3-4, p.249- 265, 2001.
- GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A., PACE, .M. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**, v.34, n.1, p.127-138, 1986.
- GIBB, Z., AITKEN, R.J. Recent developments in stallion semen preservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.43, p.29-36, 2016.

GIBB, Z., BUTLER, T.J., MORRIS, L.H. , MAXWELL, W.M., GRUPEN, C.G. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v.79, p.1001-1009, 2013.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet Clin North Am Equine Pract.**, v.12, p.131-147, 1996.

GRAHAM, J.K., KUNZE, E., HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, n.1, p.55-64, 1990.

GRAVANCE, C.G., GARNER, D.L., BAUMBER, J., BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v.53, n.9, p.1691-703, 2000.

HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K., NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, n.1, p.73-88, 1990.

HOFFMANN, N., OLDENHOF, H., MORANDINIC, C., ROHNB, K., SIEMEA, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. **Animal Reproduction Science**, v.125, p.112-118, 2011.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, n.1-3, p.3-22, 2000.

JOHNSON, L., BLANCHARD, T.L., VAMER, D.D., SCRUTCHFIELD, W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, v.48, p.1199-1216. 1997.

KAEOKET, K., SANG-URAIL, P., THAMNIYOM, A., CHANAPIWAT, P., TECHAKUMPHU, M. Effect of Docosahexaenoic Acid on Quality of Cryopreserved Boar Semen in Different Breeds. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.458-463, 2010.

KAKA, A., WAHID, H., ROSNINA, Y., YIMER, N., KHUMRAN, A.M., BEHAN, A.A., KAKA, U., EBRAHIMI, M. Effect of docosahexanoic acid (DHA) on quality of frozen-thawed bull semen using Tris extender. 6th Pan Commonwealth Veterinary Conference of the CVA and 27th Veterinary Association Malaysia, p.191-193, 2015a.

KAKA, A., WAHID, H., ROSNINA, Y., YIMER, N., KHUMRAN, A.M., SARSAIFI, K., BEHAN, A.A., KAKA, U., MEMON, A.A., EBRAHIMI, M. Effect of docosahexanoic acid on quality of frozen-thawed bull semen in BioXcell extender. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, n.3, p.490-495, 2015b.

- KATILLA, T. In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.42 no.2, p.199-217, 2001
- KREMER, J. The Significance of Antoni van Leeuwenhoek for the Early Development of Andrology. **Andrologia**, v.11., n.4, p.243-249, 1979.
- LIMA, R.A.S. **A expansão do cavalo crioulo**. Animal Business Brasil, Rio de Janeiro, n.6, p.44-49, 2012.
- LIMA, R.A.S., CINTRA, A.G. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Brasília: Assessoria de Comunicação e Eventos do MAPA, 50p, 2015.
- LOOMIS, P.R. Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. **Vet Clin Equine**, v.22, p.663–676, 2006.
- 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.
- MALDJIAN, A., PIZZI, F., GLIOZZI, T., CEROLINI, S., PENNY, P., NOBLE, R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar sêmen. **Theriogenology**, v.63, p.411-421, 2005.
- MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen: A review. **Theriogenology**, v.48, n.4, p.523-530, 1997.
- MARTINS, H.S., SILVA, G.C., CORTES, S.F., PAES, F.O., MARTINS-FILHO, O.A., ARAUJO, M.S.S., STAHLBERG, R., LAGARES, M.A. Lactoferrin increases sperm membrane functionality of frozen equine semen. *Reprod Dom Anim*, **Reproduction in Domestic Animals**, p.-17, 2018.
- MEDEIROS, A.S.L., GOMES, G.M., CARMO, M.T., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using diferente amides. *Theriogenology*, v.58, p.273-276, 2002.
- MEDEIROS, A.S.L. **Cryopreservation of stallion sperm utilizing different amides**. Master Thesis. University of São Paulo State-UNESP, Botucatu, 123p., 2003.
- MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKER, A. R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.757-763, 2005.
- MERYMAN, H.T. Review of biological freezing. In: MERYMAN, H.T. **Cryobiology**. Academic Press, London, p.1-114.

MICHAEL, A.J., ALEXOPOULOS, C., PONTIKI, E.A., HADJIPAVLOU-LITINA, D.J., SARATSIS, P., VERVERIDIS, H.N., BOSCO, C.M. Effect of antioxidant supplementation in sêmen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.112, p.119-135, 2009.

MOFFET, P.D., BRUEMMER, J.E., CARD, C., SQUIRES, E.L. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. **Proceedings Society for Theriogenology Annual Conference**, 42 (abstract), 2003.

MORILLO-RODRÍGUEZ, A., MACÍAS-GARCÍA, B., TAPIA, J.A., ORTEGA-FERRUSOLA, C., PEÑA, F.J. Consequences of butylated hydroxytoluene in the freezing extender on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa in vitro. **Andrologia**, v.44, p.688-95, 2012.

MORTIMER, S.T. CASA-practical aspects. **Journal of Andrology**, v.21, n.4, p.515-24, 2000.

NAGY, S, JANSEN J., TOPPER, E.K., GADELLA, B.M. A triple-stain flow cytometric method to assess plasm- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction**, Madison, v.68, n.5, p.1828-1835, 2003.

NASIRI, A.H., TOWHIDI, A., ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and a-tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, v.44, p.550-555, 2012.

NASIRI, A.H., TOWHIDI, A., ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, v.44, p.550-555, 2012.

OLDENHOF, H., BIGALK, J., HETTEL, C., BARROS, L.O., SYDYKOV, B., BAJCSY, A.C., SIEME, H., WOLKERS, W.F. Stallion Sperm Cryopreservation Using Various Permeating Agents: Interplay Between Concentration and Cooling Rate. **Biopreservation and Biobanking**, v.15, n.5, p.1-10, 2017.

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**, Goiânia, v.14, n.4, p.488-494, 2013.

OSÓRIO, J.P., CANISSO, I.F., SOUZA, F.A., SILVA, E.C., LIMA, A.L. Princípios do Congelamento de Sêmen do Garanhão. **UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.10, n.2, p.15-22, 2008.

- PARADOWSKA-DOGAN, A., FERNANDEZ, A., BERGMANN, M., KRETZER, K., MALLIDIS, C., VIEWEG, M., WALISZEWSKI, P., ZITZMANN, M., WEIDNER, W., STEGER, K., KLIESCH, S. Protamine mRNA ratio in stallion spermatozoa correlates with mare fecundity. **Andrology**, v.2, p.521–530, 2014.
- PARKS, J. E., GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.209-222, 1992.
- PARKS, J.E., LYNCH, D.V. Lipid Composition and Thermotropic Phase Behavior of Boar, Bull, Stallion, and Rooster Sperm Membranes. **Cryobiology**, v.29, p.255-266, 1992.
- PEGG, D.E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.20, n.1., p.5-13, 2002.
- ROOKE, J.A., SHAO, C., SPEAKE, B.K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of sêmen. **Reproduction**, v.121, p.315-322, 2011.
- SAMADIAN, F., TOWHIDI, A., REZAYAZDI, K., BAHREINI, M. Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. **Animal**, v.4, p.2017-2022, 2010.
- SAMPAIO, B.F.B., SILVA-JUNIOR, E.R., BORTOLETTO, L.P., SILVA, E.V.D., ZÚCCARI, C.E.S.N. Óleo de fígado de bacalhau ou colesterol solúvel em água no diluidor de congelação aumentam a crioresistência do espermatozoide equino? **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecedor, Goiânia, v.11, n.21, p.1432-1443, 2015.
- SANTOS, M.A., GRADELA, A., MORAES, E.A., SOUZA, W.L., ALVES, N.G., COSTA, J.M.S., MATOS, W.C.G. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35 n.11, p.925-932, 2015.
- SIELHORST, J. HAGEN, C., BEHRENDT, D., SCHUETTE, B., BURGER, D., MARTINSSON, G., SIEME, H. Effect of Multiple Freezing of Stallion Semen on Sperm Quality and Fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.40, p.56–61, 2016.
- SIKKA, S.C. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. **Journal of Andrology**, v.25, n.1, p.5-18, 2004.
- SILVA, P.F., GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, n.5, p.958-78, 2006.
- 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, n.4, p.370-384, 2011.

SILVA, N.C., LEÃO, K.M., MARQUES, T.C., SILVA, R.P., RODRIGUES, M.C. Ação de antioxidantes na manutenção da viabilidade espermática de sêmen bovino criopreservado. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecedor, Goiânia, v.9, n.17, p.17-32, 2013.

SILVA, D.M., HOLDEN, S.A., LYONS, A., SOUZA, J.C., FAIR, S. In vitro addition of docosahexaenoic acid improves the quality of cooled but not frozen-thawed stallion semen. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, n.10, p.2021-2027, 2017.

SILVA-JUNIOR, E.R., SILVA, Y.F.R.S., CAVALERO, T.M.S., GARCIA, V.F.C., SAMPAIO, B.F.B., DELL'AQUA, C.P.F., PAPA, F.O. Efeito do DHA sobre a qualidade do sêmen congelado de garanhões – resultados preliminares. **Anais XVII Conferência Anual Abraveq**, Campos do Jordão, p.265-266, 2016.

SMILEY, S.T., REERS, M., MOTTOLA-HARTSHORN, C., LIN, M., CHEN, A., SMITH, T.W., STEELE-JUNIOR, G.D., CHEN, L.B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.88, n.9, p.3671-3675, 1991.

SQUIRES, E.L. Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse industry? **Journal of Equine Veterinary Science**, v.29, n.5, p.268-273, 2009.

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

TIRAPELLE, C. **Effect of DHA supplementation during stallion semen cryopreservation on sperm characteristics**. 2013. 73f. Monografia (Conclusão de curso em Medicina Veterinária) – Università Degli Studi di Padova, 2013.

THOMAS, C.A., GARNER, D.L., DEJARNETTE, J.M., MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.56, n.4, p.991-8, 1997.

TOWHIDI, A., PARKS, J.E. Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. **Journal Assisted Reproduction and Genetics**, v.29, p.1051-1056, 2012.

VARNER, D.D. Developments in stallion sêmen evaluation. **Theriogenology**, v.70, n.3, p.448-462, 2008.

VARNER, D.D., JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View: Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. In: MCKINNON, A. O. et al. (Ed.), **Equine Reproduction**. 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltda., 2011. Cap.98, p.909-990, 3310 p.

VASQUEZ, J.M., MARTINEZ, E.A., MARTINEZ, P., GARCIA, A.C., ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p.913-922, 1997.

WATHES, D.C., ABAYASEKARA, D.R.E., AITKEN, R.J. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction. *Biology of Reproduction*, v.77, p.190-201, 2007.

WATSON, P.F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessments of their post-thawing function. **Reproduction of Fertility and Development**, East Melbourne, v.7, n.4, p.781-891, 1995.

WATSON, P.F., The causes of reduced fertility with cryopreserved sêmen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

YIMER, N., KAKA, A., YUSOFF, R., HARON, A.W. The Roles of Antioxidants and Fatty Acids in Sperm Cryopreservation. **Cryopreservation in Eukaryotes**, IntechOpen, v.7, p.103-120, 2016.