

CAROLINA CAMARGO ROCHA

**Identificação e quantificação da carnosina no plasma seminal,
características seminais e congelabilidade do sêmen de
garanhões**

São Paulo

2017

CAROLINA CAMARGO ROCHA

Identificação e quantificação de carnosina no plasma seminal, características seminais e congelabilidade do sêmen de garanhões

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcílio Nichi

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3478
FMVZ

Rocha, Carolina Camargo
Identificação e quantificação da carnosina no plasma seminal, características
seminalis e congelabilidade do sêmen de garanhões / Carolina Camargo Rocha. -- 2017.
91 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcilio Nichi.

1. Plasma seminal. 2. Carnosina. 3. Garanhões. 4. Estresse oxidativo. 5.
Criopreservação. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Identificação e quantificação da carnosina no plasma seminal, características seminais e congelabilidade do sêmen de garanhões", protocolada sob o CEUA nº 9172150316, sob a responsabilidade de **Marcílio Nichi e equipe; Carolina Camargo Rocha** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 06/10/2016.

We certify that the proposal "Identification and quantification of carnitine in seminal plasma, semen characteristics and freezability of semen stallions", utilizing 7 Equines (7 males), protocol number CEUA 9172150316, under the responsibility of **Marcílio Nichi and team; Carolina Camargo Rocha** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 10/06/2016.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [04/2016](#) a [07/2016](#)

Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 23 anos](#)

N: [07](#)

Linhagem: [Mangalarga Paulista](#)

Peso: [300 a 500 kg](#)

Resumo: A criação de equinos tem sido desenvolvida ativamente no Brasil, portanto, o interesse dos proprietários em biotécnicas reprodutivas equinas está aumentando. Entretanto, o sêmen equino tem baixa tolerância a criopreservação e o estresse oxidativo representa um maior problema causando efeito deletério na célula espermática. O plasma seminal possui efeitos protetores na membrana do espermatozoide e a prevenção da capacitação prematura dos mesmos durante o processo de criopreservação. Sendo esses alguns fatores determinantes para o sucesso dessa biotécnica. Já a remoção do plasma seminal durante o processo de criopreservação aumenta o estresse oxidativo. Antioxidantes presentes no plasma seminal promovem um papel importante na proteção do espermatozoide. O plasma seminal é composto de várias substâncias, uma delas é a carnosina. A carnosina possui um efeito antioxidante e redução na taxa dos telômeros. O objetivo do presente estudo é identificar e quantificar carnosina no plasma seminal e comparar as características do sêmen fresco e pós descongelação entre os garanhões que serão classificados, de acordo com as características seminais em bons e maus congeladores. Sete garanhões da raça (Mangalarga Paulista) serão coletados duas vezes (idades entre 2,5 e 23 anos de idade). As coletas de sêmen serão realizadas em abril de 2016. O sêmen fresco e pós-descongelação serão prontamente avaliados para motilidade, vigor, concentração, integridade de acrossoma e membrana plasmática, atividade mitocondrial, (SCSA) para susceptibilidade a denaturação de cromatina e TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). A carnosina do plasma seminal será mensurada utilizando um kit de ELISA comercial.

Local do experimento: A primeira fase do experimento consistirá na colheita do sêmen. Os garanhões da raça Mangalarga Paulista serão coletados na Fazenda Santa Rita II localizada na cidade de Piracaia-SP. A segunda fase de análises laboratoriais do sêmen será desenvolvida no Laboratório de Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), no Departamento de Reprodução Animal (VRA) em São Paulo, SP.

São Paulo, 21 de fevereiro de 2017



Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ROCHA, CAROLINA CAMARGO.

Título: Identificação e quantificação de carnosina no plasma seminal,
características seminais e congelabilidade do sêmen de garanhões

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À Deus, por me dar a vida, por me abençoar com saúde e família maravilhosa.

Minha família (pais, irmãos, primas e primos, tias e tios) que eu amo.

Ao Gui (meu marido) que sempre me deu força de longe ou de perto com muito amor e carinho. Te amo.

Amigos inesquecíveis dos quais levarei para sempre no meu coração.

Oportunidades pelas quais me fazem errar e acertar todos os dias, me tornando uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde, força e poder abrir os olhos todos os dias e poder vivenciar dias de aprendizagem e esse mundo maravilhoso que ele nos proporcionou.

À professora Valquíria Hyppolito Barnabe, que abriu as portas do Laboratório e me concedeu a hora da sua orientação, paciência e amizade.

Ao professor Renato Campanarut Barnabe (*in memória*), pela hora de ter conhecido uma pessoa tão inteligente, gentil e agradável.

Ao Marcílio, meu orientador, amigo e grande professor. Por todos esses anos de ensinamento, orientação direta e indireta e um amigo de um enorme coração.

À minha família (Aloisio, Vera, Rodolfo e Diego), que é meu suporte e me deu ensinamentos preciosos de amor, respeito e perseverança. Sempre me orientaram e incentivaram com muito carinho e amor, não teria chegado aqui sem eles.

À minha prima Cintia, em particular, por ser minha prima, irmã, amiga, mãe, sempre a tive com todo meu carinho e amor.

Aos meus tios e tias, primos e primas que se preocupam comigo e que tenho um grande amor.

Ao meu marido, Guilherme que durante esses cinco anos, me incentivou e apoio nos momentos bons e ruins. Pelo carinho, amor e companheirismo. Te amo.

À minha cachorra Amora, muito amada e querida, sempre me dando muito amor, carinho e pêlos pela casa e roupas.

Aos meus amigos do VRA-LA que tenho um carinho imenso (João Rafael, João Diego, Guta, Giulia, Andressa, Brunão, Dani, Nívea, Bárbara, Luana, Roberta, Mariana, Brown, Rodrigo Cabra, Paola, todos eles passaram pela minha vida cada um de forma muito especial, desde o mestrado até hoje. Penso que as pessoas que cruzam nossos caminhos não são por acaso e sim por um propósito e agradeço cada uma delas por eu tê-las conhecido e tido o prazer da amizade. Muito obrigada.

À Guta, pois sem ela esse trabalho não teria essa proporção, nos ensinou, pegou no pé (Rs), e ajudou a fazer acontecer. Muito obrigada por tudo e principalmente sua amizade.

À Giulia, que abraçou esse projeto como se fosse o dela, sempre muito organizada, dedicada e esforçada. Japa você é uma grande amiga.

Ao João Diego (Diegoski), pessoa muito especial, educada, inteligente e dedicada. Agradeço pela imensa ajuda e amizade.

Ao Cabral, meu professor, orientador de graduação e grande amigo. Obrigada por tudo.

À Camila Mota, Jorge Flório e Prof. Ricardo pela paciência e enorme ajuda das minhas análises.

À todos os professores do Departamento de Reprodução Animal: Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi, Prof. Dr. Rica Pereira, Prof. Dr. Marcelo Acindo de Barros Vaz Guimarães (*in memória*), Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Prof. Dr. José Antônio Visintin, Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, Profa. Dra. Mayra Helena Ortiz D'Avila, Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes, Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi, Prof. Dr. Mário Binelli, Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade e Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda pelos ensinamentos.

À todos meus amigos do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da FMVZ-USP pela amizade, risadas e ajuda.

Agradeço a colaboração do Daniel da empresa Bothufarma pela doação de materiais para a pesquisa, a qual contribuiu para a produção deste projeto.

Aos meus amigos: Geissiane, Neide, Roxane, Geise, Aline, Maurão, Lude, Vicky, Raquel, Betinha, Mara, Gabriel, José Pedro, Carol, Dega, Fernando, Fernanda, Eliane, Sérgio, Dona Conceição, Celso, Dona Jacira, Dona Selma, Sr. Hirochi pela amizade e boas risadas.

Aos proprietários, veterinários e auxiliares que cederam seu tempo, paciência e animais para que pudéssemos realizar essa pesquisa.

Aos animais que participaram do experimento.

Aos funcionários do VRA: Harumi, Miguel, Roberta, Lóide, Claudia, Luiz, Irailton, Belau, Dona Sandra, Priscila e Jocimar sem eles o VRA não funcionaria.

Ao Programa de pós-graduação (VRA FMVZ-USP), CAPES pela bolsa e FAPESP pelo auxílio da pesquisa.

RESUMO

ROCHA, C. C. **Identificação e quantificação da carnosina no plasma seminal, características seminais e congelabilidade do sêmen de garanhões.** Identification and quantification of carnosine in seminal plasma, seminal characteristics and freezing of semen from stallions. 2017. 91f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2017.

A criação de equinos tem se desenvolvido ativamente no Brasil. Assim, o interesse dos proprietários em biotecnologias reprodutivas equinos vem aumentando. Entretanto, o sêmen equino tem baixa tolerância à criopreservação comparada com outras espécies, sendo o estresse oxidativo um entrave por seus efeitos deletérios sobre a célula espermática. Neste contexto, o plasma seminal possui antioxidantes que promovem um papel importante na proteção do espermatozoide. Porém o, durante o processo de criopreservação, o plasma seminal é retirado. Em estudo anterior verificamos que, na ausência do plasma seminal os espermatozoides equinos tornam-se mais susceptíveis ao estresse oxidativo, principalmente causado pelo malondialdeído (MDA), subproduto da oxidação de lipídeos. Um dos motivos para este resultado seria a retirada da carnosina, um dos principais antioxidantes responsáveis pela proteção contra o acúmulo de MDA e seus efeitos deletérios, presente no plasma seminal. O objetivo do presente estudo é identificar e quantificar carnosina no plasma seminal de garanhões e comparar as características seminais em diferentes grupos de bons e maus refrigeradores e congeladores, baseando-se na análise da motilidade posterior ao processo de refrigeração e congelação. Foram colhidos dois ejaculados de quarenta garanhões (idades entre 4 e 16 anos de idade). As variáveis analisadas foram cinética espermática pelo sistema CASA, avaliação funcional (coloração de eosina-nigrosina para membranas, fast-green/rosa bengala para acrossomos, coloração 3-3'diaminobenzidina para atividade mitocondrial e SCSA™ para susceptibilidade a denaturação de cromatina) e avaliação do índice de peroxidação lipídica (TBARS) do espermatozoide e do plasma seminal. Também foram realizadas análises da integridade de membranas plasmática e acrossomal, e potencial de atividade mitocondrial pelas sondas fluorescentes PI, Hoescht 33342, FITC-PSA e JC-1 além da produção de (ROS) pelo espermatozoide com a sonda fluorescente CellRox. A carnosina do

plasma seminal foi mensurada utilizando kit de ELISA Biomatik® comercial. Foram comparados os grupos bons e maus refrigeradores, e bons e maus congeladores ($p \leq 0,05$). Verificamos uma maior concentração de carnosina nos bons refrigeradores em relação aos que refrigeraram mau. Isso pode ter ocorrido pela maior concentração de TBARS no plasma seminal destes animais, possivelmente por um efeito fisiológico de reações de oxidação. Além disto, os bons refrigeradores apresentaram porcentagens significativamente maiores de células com alta atividade mitocondrial, acrossomo intacto e membrana intacta sugerindo um efeito benéfico da carnosina. Em relação ao efeito da congelação do sêmen, não foi observada diferença na concentração de carnosina entre os que congelaram bem ou não. Este resultado era esperado uma vez que, durante o processo de criopreservação do sêmen equino o plasma seminal é retirado. De fato, a maior porcentagem de células com lesão mitocondrial, de membrana e DNA lesado nos maus congeladores e as correlações entre as lesões e o estresse oxidativo pode indicar um mecanismo mitocondrial de geração de estresse oxidativo e consequente lesão das estruturas celulares. Conclui-se que a carnosina apresentou efeito protetor durante a refrigeração espermática protegendo contra injúrias causadas pela mesma e consequentemente é um dos fatores que melhora a qualidade espermática após 24 horas de refrigeração.

Palavras-chave: Plasma seminal. Carnosina. Estresse oxidativo. Refrigeração. Criopreservação.

Abstract

ROCHA, C. C. **Identification and quantification of carnosine in seminal plasma, seminal characteristics and freezing of semen from stallions.** Identificação e quantificação da carnosina no plasma seminal, características seminais e congelabilidade do sêmen de garanhões. 2017. 91f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2017.

Equine breeding has been actively developing in Brazil, leading to increased interest in reproductive biotechnology. However, there is a limitation due to a tolerance of some stallions to cryopreservation, especially when compared to other species. In this context, oxidative stress represents an obstacle due to its deleterious effects on equine sperm. To counterattack such effect, seminal plasma has antioxidants that play an important role in protecting the sperm. However, during the cryopreservation process, the seminal plasma is withdrawn. In a previous study we verified that, in the absence of seminal plasma, equine spermatozoa are more susceptible to oxidative stress, mainly caused by malondialdehyde (MDA), a product of lipid oxidation. One of the reasons for this result would be the removal of carnosine present in the seminal plasma, one of the main antioxidants responsible for protection against the MDA accumulation and its deleterious effects. The objective of the present study was to identify and quantify carnosine in the seminal plasma of stallions and to compare the seminal characteristics in different groups of sperm samples with high and low tolerance to the cryopreservation or cooling, based on analysis of total motility after these processes. Two ejaculates of forty stallions (N= 80; ages between 4 and 16 years old) were collected. Each ejaculate was divided into two aliquots, one submitted to a 24h cooling and the other submitted to cryopreservation. The variables analyzed were: Computer Assisted Sperm Analysis (CASA system), functional evaluation (eosin-nigrosin stain for membranes, fast-green/rose bengal for acrosomes, 3,3'-diaminobenzidine staining for mitochondrial activity and SCSA™ for susceptibility to chromatin denaturation) and lipid peroxidation index (TBARS assay) of sperm and seminal plasma. Furthermore, plasma and acrosomal membranes integrities and mitochondrial membrane potential were also analyzed using the fluorescence probes PI, Hoescht 33342, FITC-PSA, JC-1

and ROS detection by CellRox fluorescent probes. Carnosine from the seminal plasma was measured using commercial Biomatik® ELISA kit. Thus, samples with high and low tolerance were compared ($p \leq 0.05$). We found a higher concentration of carnosine in good cooler compared to those showing low motility. This may have occurred in response to the higher concentration of TBARS in the seminal plasma of these animals, possibly due to a physiological effect of oxidation reactions. In addition, good coolers presented significantly higher percentages of cells with high mitochondrial activity, intact acrosome and intact membrane suggesting a beneficial effect of carnosine. Regarding the effect cryopreservation, no difference was observed between those with high and low post-thaw motility. This result was expected since, during the cryopreservation process of equine semen, the seminal plasma is removed. In fact, the higher percentage of cells with mitochondrial lesions, damaged membrane and fragmented DNA in bad freezers and the correlations between lesions and oxidative stress may indicate a mitochondrial mechanism of oxidative stress generation and consequent lesion of cellular structures. In conclusion, carnosine had a protective effect during sperm cooling, protecting against damages being probably one of the factors that improves sperm quality after 24 hours of refrigeration.

Keywords: Seminal plasma. Carnosine. Oxidative stress. Cooling. Cryopreservation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais.....	40
Figura 2 - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais.....	41
Figura 3: Manual das análises setup para equinos do CASA; Hamilton Thorne, Ceros 12.3.....	43
Figura 4 - Efeito da refrigeração (MR: má refrigeração, BR: boa refrigeração) na detecção do <i>status</i> oxidativo do plasma seminal (TBARSPS) e das concentrações de carnosina (CAR) do plasma seminal – São Paulo – 2017	57
Figura 5 - Efeito da refrigeração (MR: má refrigeração, BR: boa refrigeração) na detecção de espécies reativas de oxigênio e na integridade de membrana plasmática (ROX+MI: espécies reativas de oxigênio positiva e integridade de membrana; ROX+ML: espécies reativas de oxigênio positiva e alteração de membrana; ROX-ML: espécies reativas de oxigênio negativa e alteração de membrana; ROX-MI: espécies reativas de oxigênio negativa e integridade de membrana) – São Paulo – 2017	57
Figura 6 - Efeito da refrigeração (MR: má refrigeração, BR: boa refrigeração) na integridade das membranas plasmática e acrossomal (ALMI: acrossomo lesado e membrana plasmática íntegra, ALML: acrossomo lesado e membrana plasmática lesada, AIML: acrossomo íntegro e membrana plasmática lesada, AIMI: acrossomo íntegro e membrana plasmática íntegra) – São Paulo – 2017.....	58
Figura 7 - Efeito da refrigeração (MR: má refrigeração, BR: boa refrigeração) nas atividades mitocondrial alta (DABI), média (DABII), baixa (DABIII) e nula (DABIV) – São Paulo – 2017	59
Figura 8 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) nas atividades mitocondrial alta (DABI), média (DABII), baixa (DABIII) e nula (DABIV) – São Paulo – 2017	60
Figura 9 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) nos potenciais de membrana mitocondrial alto (JCA), intermediário (JCI), baixo (JCB) - São Paulo - 2017	60

Figura 10 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) na avaliação do <i>status</i> oxidativo do plasma seminal (TBARSPS) – São Paulo – 2017	61
Figura 11 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) na detecção de espécies reativas de oxigênio e na integridade de membrana plasmática (EOPMI: espécies reativas de oxigênio positiva e integridade de membrana; EOPML: espécies reativas de oxigênio positiva e alteração de membrana; EONML: espécies reativas de oxigênio negativa e alteração de membrana; EONMI: espécies reativas de oxigênio negativa e integridade de membrana) – São Paulo – 2017.....	61
Figura 12 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) na fragmentação de DNA – São Paulo – 2017	62
Figura 13 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) nos potenciais de membrana mitocondrial alto (JCA), intermediário (JCI), baixo (JCB) - São Paulo - 2017	63
Figura 14 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) na integridade das membranas plasmática e acrossomal (ALMI: acrossomo lesado e membrana plasmática íntegra, ALML: acrossomo lesado e membrana plasmática lesada, AIML: acrossomo íntegro e membrana plasmática lesada, AIMI: acrossomo íntegro e membrana plasmática íntegra) – São Paulo – 2017	63
Figura 15 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) nas cinéticas espermáticas: retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017.....	64
Figura 16 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na motilidade total (MOTILE) após 24 horas de refrigeração – São Paulo - 2017.....	65
Figura 17 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na velocidade média (MEDIUM) após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017	66

Figura 18 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na velocidade lenta (SLOW) após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017.....	66
Figura 19 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na avaliação do <i>status</i> oxidativo do plasma seminal após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017.....	67
Figura 20 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na detecção de espécies reativas de oxigênio e na integridade de membrana plasmática (EOPMI: espécies reativas de oxigênio positiva e integridade de membrana; EOPML: espécies reativas de oxigênio positiva e alteração de membrana; EONML: espécies reativas de oxigênio negativa e alteração de membrana; EONMI: espécies reativas de oxigênio negativa e integridade de membrana) após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017.....	68
Figura 21 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na integridade das membranas plasmática e acrossomal (ALMI: acrossomo lesado e membrana plasmática íntegra, ALML: acrossomo lesado e membrana plasmática lesada, AIML: acrossomo íntegro e membrana plasmática lesada, AIMI: acrossomo íntegro e membrana plasmática íntegra) após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017.....	69
Figura 22 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na velocidade de trajeto (VAP) pós descongelação – São Paulo – 2017.....	69
Figura 23 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) nas atividades mitocondrial alta (DABI), média (DABII), baixa (DABIII) e nula (DABIV) pós descongelação – São Paulo – 2017.....	70
Figura 24 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na detecção de espécies reativas de oxigênio e na integridade de membrana plasmática (EOPMI:	

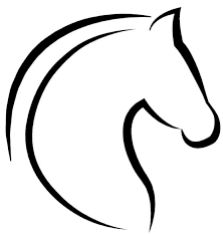
espécies reativas de oxigênio positiva e integridade de membrana; EOPML: espécies reativas de oxigênio positiva e alteração de membrana; EONML: espécies reativas de oxigênio negativa e alteração de membrana; EONMI: espécies reativas de oxigênio negativa e integridade de membrana) pós descongelação – São Paulo – 2017..... 71

Figura 25 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) nos potenciais de membrana mitocondrial alto (JCA), intermediário (JCI), baixo (JCB) pós descongelação – São Paulo – 2017..... 71

Figura 26 – Teste de paralelismo para a validação do kit de ELISA de carnosina no plasma seminal de equinos..... 72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1. Refrigeração seminal	23
2.2. Criopreservação espermática	24
2.3. Espécies Reativas de Oxigênio e o Espermatozoide: efeitos fisiológicos e citotóxicos	25
2.4. Carnosina.....	27
3. HIPÓTESES	32
4. OBJETIVOS	34
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1. Local	36
5.2. Animais	36
5.3. Período experimental	37
5.4. Manejo alimentar.....	37
5.5. Coleta e avaliação do sêmen <i>in natura</i>	37
5.6. Processamento e refrigeração seminal.....	38
5.7. Processamento e criopreservação seminal	39
5.8. Avaliações espermáticas das amostras refrigeradas e criopreservadas	42
5.8.1. Avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA)	42
5.8.2. Avaliação da função espermática	44
5.9. Avaliação da susceptibilidade à peroxidação lipídica (TBARS)	48
5.10. Teste de ELISA.....	49
5.11. Padronização da carnosina pelo kit de ELISA	50
5.11.1. Teste de paralelismo.....	50
5.11.2. Quantificação da carnosina pelo método de ELISA.....	51
5.11.3. Preparação dos reagentes do kit de ELISA	51
5.11.4. Procedimento de ensaio	52
5.11.5. Delineamento experimental	53
5.12. Análise estatística	54
6. RESULTADOS	56
7. DISCUSSÃO	74
8. CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS	88



Introdução

1. INTRODUÇÃO

A equideocultura brasileira é um setor crescente da economia e tem gerado 640 mil empregos diretos, 200.000 indiretos e movimentado R\$ 7,3 bilhões por ano (LIMA et al., 2006), atingido em 2015 um total de R\$ 16 bilhões de reais. No Brasil, a população de equídeos é estimada atualmente em 7.986.023 cabeças, sendo 5.541.702 equinos, 1.130.795 asininos e 1.313.526 muares. A população nacional de equinos é a terceira maior do mundo, posição que se manteve estável na última década (IBGE, 2015).

Com a alta demanda, as técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE), vêm sendo amplamente empregadas. A inseminação artificial possui diversas vantagens como: maximizar o melhoramento genético do rebanho permite inseminações em animais que estão competindo ou que já vieram a óbito, proporciona bons índices de fertilidade, além de não necessitar a presença física do garanhão selecionado, diminuindo o estresse induzido pelo transporte e possíveis acidentes (WEISS et al., 2003; AVANZI et al., 2006).

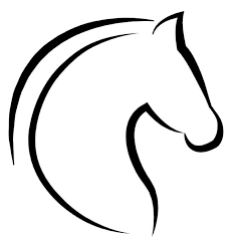
Neste contexto, a refrigeração e a criopreservação espermática, são biotécnicas chave na reprodução assistida equina. No entanto, sabe-se que estes procedimentos diminuem a viabilidade espermática (BRINSKO; VARNER, 1992). Este efeito deletério parece ser multifatorial, podendo ser causado por choques térmico e osmótico, desidratação celular excessiva, formação de cristais de gelo e alterações na permeabilidade da membrana plasmática (WATSON, 1995). No entanto, todos estes fatores podem levar, direta ou indiretamente, à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), possivelmente por disfunções mitocondriais que levariam a diminuição da qualidade espermática pós-refrigeração ou descongelamento (BALL e BAUMER, 2001).

As EROs possuem um papel fundamental na fisiologia espermática, quando se encontram em equilíbrio com a capacidade antioxidante seminal, atuando como gatilhos de processos biológicos como a hiperativação e capacitação espermática, reação acrossomal, ligação entre o espermatozoide e o oócito e penetração espermática através da zona pelúcida (HOFFMANN et

al., 1996). Contudo, a produção exacerbada das EROs acompanhada ou não pela diminuição excessiva da capacidade antioxidante, caracteriza o estresse oxidativo seminal. Neste caso, as EROs podem ser extremamente deletérias causando danos às estruturas espermáticas, proteínas, carboidratos e lipídios. Além do efeito deletério das espécies reativas de oxigênio, os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), podem ser tão nocivos quanto as EROs por apresentarem meia vida mais longa (SHARMA; AGARWAL, 1996).

Em concordância à estas assertivas, estudos verificaram que o MDA pode ser extremamente citotóxico aos espermatozoides, causando redução da motilidade, aumento nos danos de DNA e diminuição da ligação espermatozoide-oócito, ocasionando a infertilidade (KO; SABANEKH; AGARWAL, 2014; AITKEN et al., 2015). Apesar dos antioxidantes convencionais não serem capazes de debelar o MDA, algumas substâncias presentes no plasma seminal, como a proteína carnosina, possuem esta função (KANG, 2005). No entanto, estudos científicos relacionando a função da carnosina do plasma seminal na homeostase oxidativa do espermatozoide são escassos. Investigações relacionadas a esta área seriam de grande valia para a espécie equina, uma vez que, a retirada do plasma seminal é necessária para a aplicação de biotécnicas do sêmen, como por exemplo, a criopreservação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Desta forma, ao quantificar e avaliar o papel da carnosina na fisiologia espermática poderemos direcionar terapias espermáticas utilizando esta proteína durante os processos de refrigeração ou criopreservação, objetivando a prevenção de danos oxidativos.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi quantificar e relacionar as concentrações de carnosina na funcionalidade e *status* oxidativo dos espermatozoides equinos que possuem alta ou baixa tolerância à refrigeração e criopreservação.



Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

Na presente revisão, serão abordados fatores relacionados aos processos de refrigeração e criopreservação do sêmen equino. Além disso, discorreremos sobre a importância do plasma seminal nestas biotecnologias, inclusive o efeito da carnosina (proteína presente neste plasma) na prevenção do estresse oxidativo e remoção dos produtos da peroxidação lipídica.

2.1. Refrigeração seminal

O sêmen refrigerado vêm sendo utilizado de maneira rotineira na indústria equina há cerca de 20 anos. Estudos sobre a tecnologia de refrigeração equina são necessários na tentativa de manter o potencial fecundante do espermatozoide por vários dias e assim permitir maior aplicabilidade desta técnica (PICKETT, 1995; BATELLIER et al., 2001). O processo de refrigeração diminui a atividade metabólica dos espermatozoides, reduz o crescimento microbiano e subsequentemente, aumenta viabilidade do sêmen por maior período de tempo (KATILA, 1997). Desta forma, tal biotécnica permite o uso de amostras seminais viáveis em técnicas de reprodução assistida por um período de 24 a 48 horas após sua coleta. (JASKO et al., 1992). Apesar da alta aplicabilidade da refrigeração seminal na reprodução assistida equina, este procedimento pode causar efeitos deletérios ao espermatozoide. Estes efeitos parecem ser mais evidentes em determinados indivíduos da espécie equina, podendo ser inclusive da mesma raça. (GRAHAM, 2011).

Assim, os ganhões podem ser classificados como bons e maus refrigeradores baseado na qualidade seminal após o período de refrigeração. Um dos principais fatores de grande variabilidade entre os ganhões pode estar relacionado principalmente à composição do plasma seminal (BRINSKO et al., 2000, KATILA, 2008).

Visto que amostras seminais de determinados garanhões possuem baixa resistência ao processo de refrigeração, possíveis alternativas para conservar estas amostras e manter a viabilidade seminal seriam de extremo interesse, principalmente em animais de elevado interesse zootécnico que possuem baixa qualidade espermática (BRINSKO et al., 2000). Ademais, parece plausível armazenar amostras destes animais durante um longo período de tempo para maximizar seu desempenho reprodutivo e perpetuar suas características genéticas nos descendentes. Portanto, apesar da refrigeração ser a técnica mais utilizada na reprodução assistida equina e com melhores resultados de fertilidade, a criopreservação espermática é uma biotécnica alternativa à refrigeração. A aplicação desta técnica de conservação vêm aumentando exponencialmente para a espécie equina e permite que os espermatozoides fiquem conservados durante longos períodos (JASKO et al., 1992).

2.2. Criopreservação espermática

A criopreservação do sêmen equino é de grande importância para a equinocultura. O espermatozoide do garanhão, no entanto, apresenta alto grau de variabilidade entre indivíduos em relação à qualidade espermática após o congelamento e descongelamento e as taxas de prenhez quando utilizadas na inseminação artificial (LOOMIS; GRAHAM, 2008). Indivíduos podem ser classificados como bons congeladores e maus congeladores, e isso implica em maior ou menor resistência ao processo de criopreservação (VIDAMENT, et al., 1997; WATSON, 2000).

Resultados de alguns estudos sugerem que aproximadamente 20 a 50% dos garanhões possuam congelabilidade inaceitável. Foi estimado que aproximadamente 20% de garanhões produzem sêmen com alta congelabilidade, 60% que congelam razoavelmente e 20% com baixa criotolerância (KATILA et al., 2001). Tais diferenças podem ser de origem genética, além disso, estudos evidenciam a importância da composição lipídica do plasma seminal e da membrana plasmática na criotolerância espermática

(VIDAMENT et al., 1997). Estes conceitos baseiam-se nas características de motilidade pós-descongelamento, incluindo percentagens de espermatozoides progressivamente móveis e taxa de velocidade (HEAPE, 1987).

Resultados satisfatórios no processo de criopreservação são dependentes da qualidade seminal, bem como das interações entre diluidores, crioprotetores e velocidades de congelação e descongelação, com intuito de minimizar os danos causados por este processo (PICKETT; AMANN, 1992). Caso a criopreservação seja realizada de maneira correta, é possível minimizar os efeitos deletérios ao espermatozoide, como o choque térmico, a formação de cristais de gelo e a desidratação celular (JASKO, 1994).

Por outro lado, durante o processo de refrigeração espermática, etapa crucial da criopreservação, mudanças estruturais e na qualidade do espermatozoide equino tem sido relacionadas à alterações nas propriedades da membrana plasmática. Entre estas modificações pode se destacar a composição e translocação de fosfolípidos que impossibilitam a movimentação aleatória dessas proteínas, resultando em aumento de permeabilidade da membrana, alterações de osmolaridade e decréscimo da atividade metabólica (HAMMERSTEDT et al., 1990; MOORE et al., 2005, SIEME et al., 2008). Ademais, estudos relatam que o processo de criopreservação pode induzir alterações semelhantes ao processo de capacitação espermática, denominada criocapacitação, causando redução na capacidade fecundante destes gametas (LOOMIS; SQUIRES, 2005). Adicionalmente, estudos tem demonstrado que a redução da qualidade espermática pós-criopreservação está relacionada à disfunções mitocondriais e conseqüente aumento exacerbado na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), caracterizando o estresse oxidativo seminal (AGARWAL et al., 2002).

2.3. Espécies Reativas de Oxigênio e o Espermatozoide: efeitos fisiológicos e citotóxicos

Algumas substâncias produzidas a partir do metabolismo de oxigênio são chamadas de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). Algumas dessas

EROs podem ser chamadas de Radicais Livres por possuírem elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Desta forma, durante o metabolismo celular aeróbio, o oxigênio molecular (O_2), sofre uma redução tetravalente resultando na formação de H_2O . Durante esse processo são formados intermediários reativos (EROs) como: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e óxido nítrico (NO_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 1999).

As espécies reativas de oxigênio desempenham um papel importante na fisiologia espermática, sendo necessárias para que ocorram os processos de hiperativação espermática, capacitação espermática, indução da reação acrossomal, ligação entre espermatozoide e oócito e penetração através da zona pelúcida (DE LAMIRANDE et al., 1997).

Apesar das EROs exercerem esta função, é necessário que haja um equilíbrio entre a quantidade de EROs gerada e a capacidade antioxidante de uma determinada amostra espermática. O plasma seminal, por sua vez, contém uma série de antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase (ALVAREZ et al., 1987), catalase (JEULIN et al., 1989) e o sistema glutatona peroxidase/glutatona redutase (CHAUDIERE; WILHELMSSEN; TAPPEL, 1984); e não enzimáticos como o ácido ascórbico e o α -tocoferol (AITKEN et al., 2010). No entanto, caso a produção de EROs sobrepuje a capacidade antioxidante seminal, ocorrerá um desequilíbrio oxidativo, denominado estresse oxidativo. Neste caso, as EROs irão causar danos à lipídios, carboidratos e às estruturas espermáticas em geral, promovendo uma redução da viabilidade celular (BALL, 2001).

O espermatozoide é uma célula particularmente susceptível ao estresse oxidativo por possuir um citoplasma extremamente reduzido, com consequente concentração limitada de enzimas antioxidantes. Além disso, a membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados, que tornam os espermatozoides mais susceptíveis à peroxidação lipídica, uma vez que as ligações duplas entre carbonos (insaturações) tornam as ligações carbono-hidrogênio adjacentes mais susceptíveis à oxidação (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004; NICHI et al., 2007). Além do efeito deletério das espécies reativas de oxigênio, os produtos da peroxidação lipídica, como o

malondialdeído (MDA, principal produto da peroxidação lipídica), podem ser tão nocivos quanto as EROs (SHARMA; AGARWAL, 1996).

O MDA apresenta alta reatividade e longevidade, além da capacidade em atuar dentro e fora das células, interagindo com biomoléculas, tais como ácidos nucleicos e proteínas causando danos irreversíveis nos mecanismos celulares (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). Diversos estudos relacionam o MDA como fator importante em diversos eventos patológicos. Por ser um potente agente neurotóxico e apresentar meia vida maior do que as EROs, seu acúmulo é crítico na patogênese do envelhecimento (NG et al., 2005), isquemia cerebral, doença de Alzheimer (LOVELL; MARKESBERY, 2007), doença de Parkinson e esclerose amiotrófica (SMITH, et al., 2012).

Além disso, o malondialdeído pode ser extremamente citotóxico aos espermatozoides, causando redução da motilidade, aumento nos danos de DNA e diminuição da ligação espermatozoide-oócito, ocasionando a infertilidade (KO; SABANEKH; AGARWAL, 2014; AITKEN et al., 2015). Ademais, em um estudo realizado por nosso grupo, observamos que espermatozoides equinos submetidos ao desafio com diferentes espécies reativas de oxigênio e ao MDA, na presença do plasma seminal, obtiveram alta susceptibilidade ao radical hidroxil. No entanto, na ausência do plasma seminal, foram extremamente susceptíveis ao malondialdeído (GURGEL, 2014), indicando que alguma substância no plasma seminal é capaz de inativar os produtos da peroxidação lipídica, que podem ser tão deletérios quanto as EROs (BONNES-TAOUREL; GUÉRIN; TORREILLES, 1992). Apesar dos antioxidantes tanto enzimáticos quanto não enzimáticos, não serem capazes de debelar o MDA, algumas proteínas como a carnosina possuem esta função. De fato, a carnosina foi identificada no sêmen de algumas espécies como suínos, ovinos (DUCCI et al., 2006) e garanhões (DUCCI et al., 2005).

2.4. Carnosina

Carnosina (β -alanil-L-histidina, CAR), anserina (β -alanil-3-metil-histidina, ANS) e homocarnosina (γ -aminobutiril-L-histidina, HCAR) são os três

dipeptídeos endógenos mais representativos do grupo dos dipeptídeos histidínicos largamente distribuída em mamíferos, em quantidades diferentes, dependendo da espécie e do tecido considerados (PETERS et al., 2011).

A carnosina (β -alanil-L-histidina) foi descoberta há 100 anos. Carnosina ou N-b-Alanil-L-histidina é um dipeptídeo de ocorrência natural, identificado originalmente em 1900, na Rússia, por Gulewitsch & Amiradzibi a partir de extrato de carne bovina (GARIBALLA; SINCLAIR, 2000). Esse dipeptídeo é encontrado naturalmente no cérebro, rins e músculo esquelético de peixes, aves e mamíferos em concentrações, às vezes, tão alta quanto 100 mmol kg⁻¹ de massa muscular seca (DUNNETT; HARRIS, 1997).

Diversos estudos atribuem a carnosina como um agente antienvelhecimento (HIPKISS, 2009). O envelhecimento está associado com a alta produção de radicais livres, bem como a glicação não enzimática (Reação de Maillard) das proteínas (HIPKISS et al., 1998). Além disto, o envelhecimento celular e a senescência são frequentemente associados ao encurtamento de telômeros. Segundo a teoria levantada por Hayflick, a cada divisão celular ocorre uma perda progressiva de telômeros, o que determina que cada célula possui um número finito de divisões (HAYFLICK, 1965). Shao e colaboradores (2004) relataram que a adição de 20mM de carnosina em fibroblastos de camundongos resultou no declínio significativo do desgaste do comprimento dos telômeros, porém, o mecanismo responsável por essa modificação não foi elucidado (HIPKISS; BAYE; DE COURTEN, 2016). Ademais, foi demonstrado que quando o dipeptídeo de ocorrência natural, a carnosina, foi adicionada à células de culturas de fibroblastos humanos, a vida útil cronológica foi aumentada, e o início da senescência foi efetivamente retardado nestas células (McFARLAND; HOLLIDAY, 1994). Também observou-se um efeito rejuvenescedor em células já senescentes, por meio da adição de carnosina (WANG et al., 2000). Além disso, um estudo revelou que a carnosina inibiu seletivamente o crescimento de células cancerosas, pelo menos em cultura (McFARLAND; HOLLIDAY, 1996).

A presença maciça de carnosina poderia ser atribuída a inúmeras funções, tais como tampão fisiológico, promotor de cicatrização de feridas, agente ionônico, especialmente para Cu e Zn, antioxidante e agente antigilante, sendo todos importantes em condições fisiológicas e patológicas

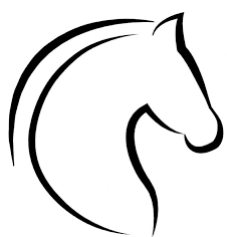
(DECKER et al., 2000). A função e o metabolismo da carnosina não foram ainda totalmente elucidados. Sabe-se que este dipeptídeo atua como sequestrador de radicais hidroxila e possui ação antioxidante (BABIZHAYEV et al., 1994; CHAN; DECKER, 1994; HIPKISS, 2009) por desempenhar um papel regulador no volume intracelular de EROs (BOLDYREV et al., 1987) e proteger a membrana mitocondrial de danos oxidativos. A função biológica da carnosina pode ter uma correlação evolutiva com sua atividade antioxidante, uma vez que, para a adaptação dos organismos à vida em um ambiente aeróbico, foi necessário o desenvolvimento de mecanismos de defesa contra os danos induzidos pelo oxigênio, especialmente pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). As espécies reativas de oxigênio podem interagir com DNA, RNA, lipídeos e proteínas e têm sido apontadas como a causa de senescência, câncer e outras doenças (KOHEN et al., 1988; WANG et al., 2000).

Além de sua função antioxidante, a carnosina elimina os produtos da peroxidação de lipídeos, principalmente o malondialdeído (MDA) (ALDINI et al. 2005; BOLDYREV, 2005; KYRIAZIS, 2010). A natureza hidrofílica da carnosina permite a aderência da molécula às fissuras na bicamada lipídica das membranas biológicas, atenuando de forma efetiva os produtos de peroxidação formado nas áreas lesadas destas estruturas celulares (KOHEN et al., 1988). Ademais, a carnosina se une aos aldeídos derivados da peroxidação lipídica, atuando como nucleófilos sacrificiais 'aldeído sequestrantes', e macromoléculas celulares, atenuando desta forma os danos e progressão do processo oxidativo (BURCHAM et al., 2002). Boldyrev e colaboradores (2013) conduziram um estudo utilizando ratos como modelo animal, onde induziram a peroxidação lipídica por meio de xenobióticos, e observou uma redução da peroxidação lipídica ao administrar carnosina.

Apesar da carnosina ter sido identificada no sêmen de suínos, ovinos (DUCCI et al., 2006) e garanhões (DUCCI et al., 2005); estudos semelhantes a estes são escassos na literatura científica. Tampouco se sabe do efeito desta proteína na função espermática e sua eficiência na debelação de MDA presente no plasma seminal. Esta informação seria de grande importância para a espécie equina uma vez que, para as biotécnicas do sêmen equino é necessária a retirada do plasma seminal, podendo reduzir a capacidade antioxidante e conseqüentemente aumentar a produção de MDA (FERREIRA;

MATSUBARA, 1997). Desta forma, identificando a presença e a função da carnosina no plasma seminal equino, futuramente podemos desenvolver terapias esperáticas utilizando a carnosina, para compensar a perda desta proteína nas biotécnicas do sêmen e aumentar a viabilidade esperática.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi quantificar e relacionar as concentrações de carnosina na funcionalidade e *status* oxidativo dos espermatozoides equinos que possuem alta ou baixa tolerância à refrigeração e criopreservação.

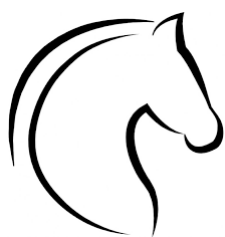


Hipóteses

3. HIPÓTESES

As hipóteses do presente experimento são:

Existe uma variação individual na concentração de carnosina no plasma seminal. Ademais, equinos que possuem amostras espermáticas com maior tolerância aos processos de criopreservação e refrigeração possuem maiores concentrações de carnosina no plasma seminal do que amostras seminais com menor tolerância.

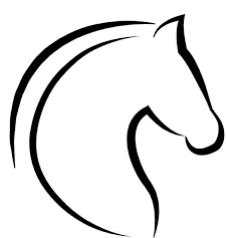


Objetivos

4. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

- Quantificar os níveis de carnosina no plasma seminal de garanhões, pelo método de ELISA,
- Relacionar os atributos espermáticos de amostras refrigeradas e criopreservadas as concentrações de carnosina na funcionalidade e *status* oxidativo dos espermatozoides equinos que possuem alta ou baixa tolerância à refrigeração e criopreservação.
- Comparar os atributos espermáticos de garanhões que possuem amostras seminais com alta e baixa resistência à refrigeração e criopreservação.



Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local

A primeira etapa do experimento consistiu na coleta, refrigeração e criopreservação seminal. Esta etapa foi realizada nos seguintes locais: Haras Santa Rita II, (Piracaia-SP); Haras ZCM Agropecuária, (Joanópolis-SP), Haras Três Rios, (Itatiba-SP), Centro Hípico Hipocampo, (Amparo-SP) e na Pontifícia Católica de Minas Gerais (PUC-MG, Poços de Caldas-MG).

A segunda etapa que consistiu nas análises laboratoriais do sêmen criopreservado, refrigerado e do plasma seminal foi realizada no Laboratório de Andrologia (LA), no Laboratório de Biologia do Espermatozoide (BioSPTZ) e no Grupo de Estudos para Multiplicação de Aves (GEMA) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) em São Paulo, SP. Além dos laboratórios supracitados, o processamento do plasma seminal foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Toxicológico (LadTox) do Departamento de Patologia Animal (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

5.2. Animais

Foram utilizados ejaculados de 40 garanhões coletados em duplicata (n= 80 ejaculados). Os animais possuíam idades variando entre 4 e 16 anos, sendo 25 garanhões da raça Mangalarga Paulista, 05 da raça Mangalarga Marchador, 01 da raça Campolina, 01 da raça Bretão, 07 da raça Lusitano e 01 da raça Quarto de Milha. Antes da avaliação e seleção dos reprodutores, foi realizado o esgotamento das reservas espermáticas extragonadais dos animais. Para tanto, os garanhões foram submetidos à duas coletas de sêmen em dias

alternados antes do início do experimento. Os mesmos estavam alojados nos respectivos haras sob manejo semi-intensivo.

5.3. Período experimental

As coletas de cada garanhão foram realizadas com intervalo de uma semana entre elas e deram-se no início da estação reprodutiva no mês de outubro com término no mês de dezembro do ano de 2016.

5.4. Manejo alimentar

Os garanhões eram mantidos em sistema semi-intensivo. Estes recebiam sal mineral e água *ad libitum*, feno, forrageira tifton e suplementação com concentrado para suprir as necessidades de manutenção de acordo com as exigências estabelecidas pela National Research Council - NRC (2001).

5.5. Coleta e avaliação do sêmen *in natura*

Previamente à coleta de sêmen, o pênis foi higienizado com solução salina aquecida (37°C) e seco com auxílio de uma compressa de algodão. A vagina artificial utilizada foi o modelo Botupharma®, composta por um tubo rígido de fibra de vidro mucosa de látex e mucosa plástica descartável, acoplada a um copo coletor isotérmico contendo uma camisa sanitária descartável, na temperatura de aproximadamente 45°C. Para realização das coletas, utilizou-se uma égua em estro devidamente contida fisicamente. Para alguns animais, foi utilizado um manequim, onde foi colocado antes da coleta urina de égua em estro, e algumas ocasiões para auxiliar o procedimento, uma égua em estro era trazida próximo ao manequim.

No momento da coleta, um filtro era colocado para separar imediatamente o gel e sujidades do restante do ejaculado. Após a obtenção da amostra, foram realizados os exames imediatos dos ejaculados: volume, motilidade, vigor e concentração.

O volume de cada ejaculado foi mensurado em tubo plástico graduado em mililitros. A motilidade (0-100%) e o vigor (escala de 0 a 5) foram observados em microscópio óptico em magnificação de 100X, utilizando uma gota de sêmen sobre uma lâmina e lamínula pré-aquecida a 37°C.

A concentração espermática foi avaliada com o auxílio de uma câmara hematómica (Neubauer) utilizando uma diluição de 1:100 (10µL de sêmen em 990µL de formol citrato tamponado). Essa avaliação foi realizada em microscópio óptico, em magnificação de 400X.

Após a coleta, uma alíquota de sêmen *in natura* de cada ejaculado foi armazenada para a avaliação do ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA™), avaliação da susceptibilidade à peroxidação lipídica (TBARS) e dosagem de carnosina no plasma seminal.

Em seguida, os ejaculados foram pré-diluídos com meio à base de leite em pó desnatado, glicose, bicarbonato de sódio e amicacina (Botu-sêmen® - Botupharma Botucatu – Botucatu-SP) em proporção de 1:1 (dilúente/sêmen). Imediatamente após este procedimento, realizou-se a concentração espermática, a fim de se obter 25 x 10⁶ espermatozoide/mL em um volume fixo de 40 mL, por meio de uma segunda diluição.

Após a diluição e homogeneização do meio junto à amostra, o volume total foi fracionado em duas partes, destinando-se a primeira alíquota para o processo de refrigeração e a segunda alíquota para a criopreservação espermática imediata.

5.6. Processamento e refrigeração seminal

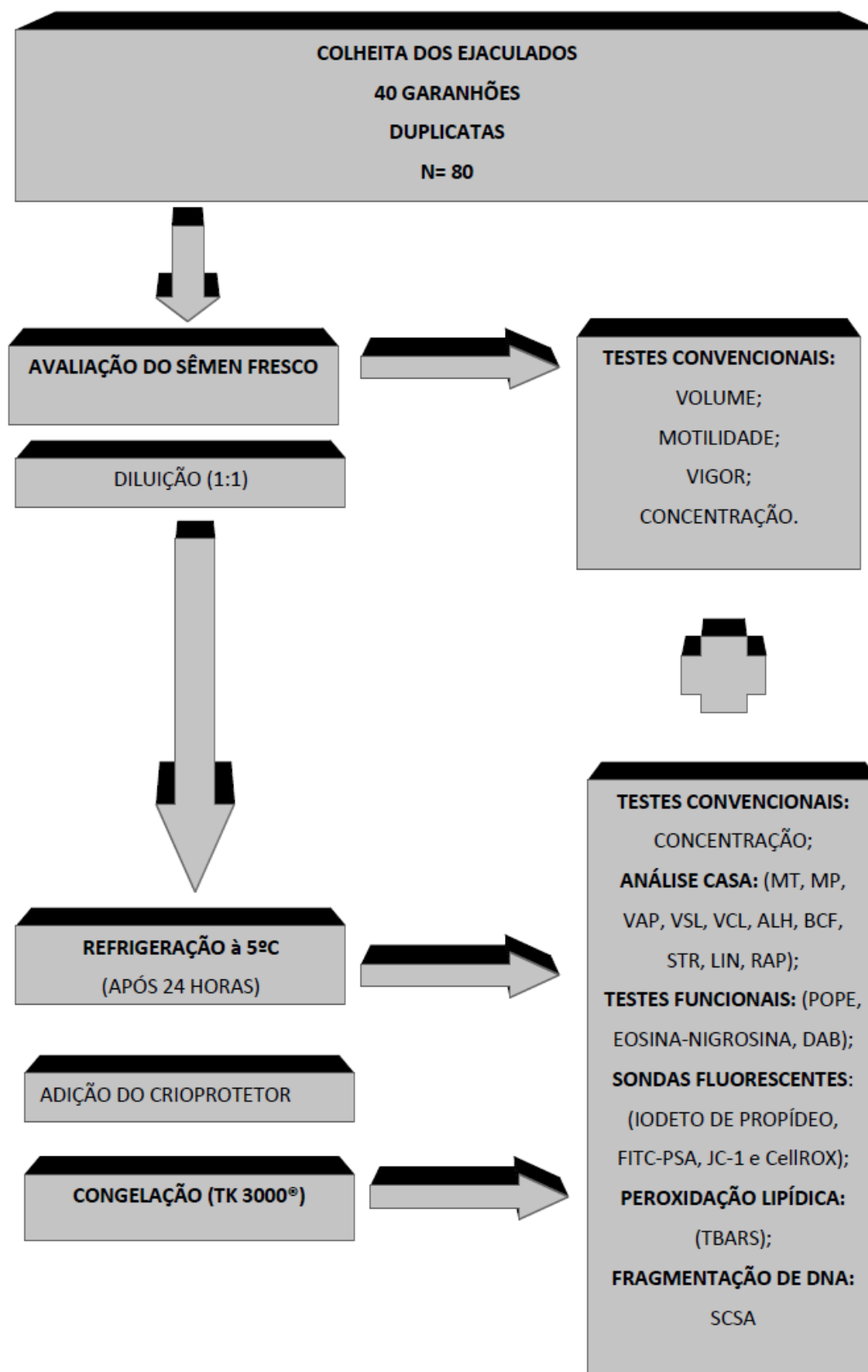
As alíquotas destinadas à refrigeração foram envasadas em recipientes de plástico (Bisnagas BOTU-IA®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), retirando-se o ar. Imediatamente após o envase as amostras foram identificadas e

alocadas, cada uma em seu respectivo dispositivo de refrigeração Botuflex® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil). As amostras foram refrigeradas à 5°C, sendo colocados dois gelos recicláveis para que estas atingissem a velocidade de refrigeração de 0,09°C/min. As mesmas foram transportadas e analisadas após um período de 24 horas de refrigeração.

5.7. Processamento e criopreservação seminal

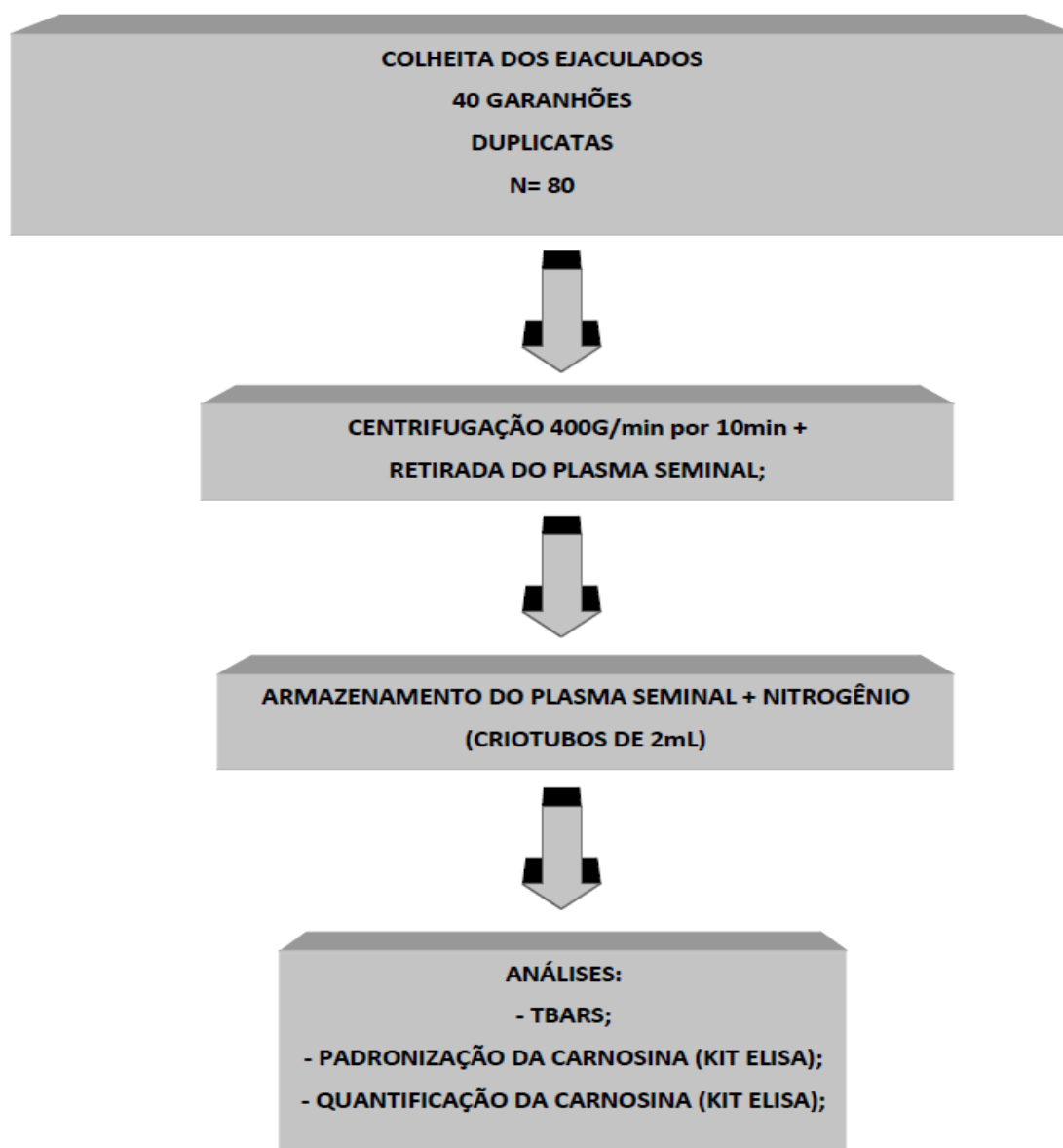
As alíquotas destinadas ao processo de criopreservação foram distribuídas em tubos plásticos com fundo cônico de 15 mL e, posteriormente centrifugadas (Centrífuga de bancada Baby® Modelo CENTRIBIO) a 400G durante 10 minutos. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foi estabelecida uma taxa de diluição de 1 mL de crioprotetor (Botucio® Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e os sedimentos de espermatozoides (pellets) foram ressuspensos para a realização de uma nova concentração e diluição a fim de obter-se 200 milhões de espermatozoides por mL. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL e as mesmas foram acondicionadas na máquina de criopreservação automatizada (TK3000® - Compacta, TK tecnologia em congelação, Uberaba, Brasil). As amostras foram submetidas a uma velocidade de refrigeração de 0,25°C por minuto até atingirem uma temperatura de 5°C. Após obterem esta temperatura, as amostras permaneceram na máquina à 5°C durante um período de 30 minutos e, posteriormente, submetidas à uma velocidade de congelação de 15°C por minuto até atingirem -120°C. Após este procedimento, as palhetas contendo as amostras foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijão de nitrogênio (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais.



As alíquotas do sêmen *in natura* destinadas à retirada do plasma seminal foram colocadas em um tubo plástico de 15 mL e foi centrifugada a 400G durante 10 minutos. O sobrenadante final foi distribuído e envasado em três criotubos identificados e, imediatamente armazenados em nitrogênio líquido e posteriormente transferidos para freezer a -80°C , onde foram mantidos até o processamento. Tais alíquotas foram destinadas à realização do ensaio TBARS, padronização e mensuração de carnosina (Figura 2).

Figura 2 - Ilustração esquemática dos procedimentos experimentais.



Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

5.8. Avaliações espermáticas das amostras refrigeradas e criopreservadas

Tanto as amostras refrigeradas quanto às criopreservadas foram submetidas às seguintes avaliações: avaliação da cinética espermática, avaliação da integridade das membranas plasmáticas (coloração Eosina-nigrosina e sonda fluorescente Iodeto de Propídeo) e acrossomal (coloração fast green – rosa bengala e sonda fluorescente FITC-PSA), atividade mitocondrial (Ensaio da 3'3 diaminobenzidina), potencial de membrana mitocondrial (sonda fluorescente JC-1), susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida (SCSA®, sonda fluorescente laranja de acridina), susceptibilidade à peroxidação lipídica (Ensaio TBARS), detecção da produção de espécies reativas de oxigênio (sonda fluorescente CellRox) e mensuração dos níveis de carnosina.

5.8.1. Avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA)

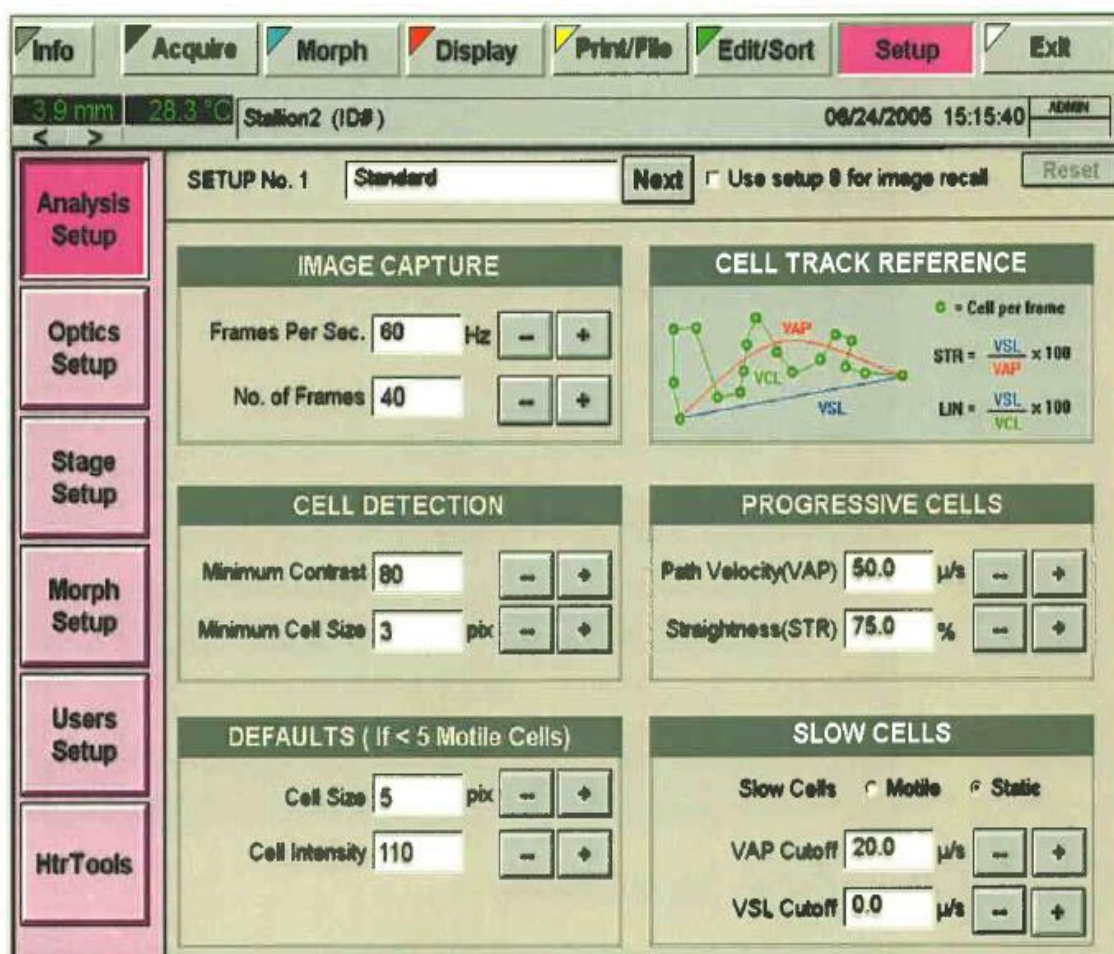
Os parâmetros da motilidade espermática das amostras refrigeradas e criopreservadas foram analisados pelo Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton Thorne IVOS 12.3, USA). As configurações foram ajustadas para a espécie equina conforme recomendações do fabricante (Figura 03). Seis μL de cada amostra espermática foram inseridos em uma câmara de contagem seja previamente aquecida a 37°C e cinco campos foram selecionados aleatoriamente. O setup utilizado foi adequado para a espécie e apresentava as seguintes configurações: 40 molduras a uma taxa de 60 molduras/segundo; contraste mínimo de 80, tamanho mínimo de célula de 3 pixels; tamanho de célula de 5 pixels e intensidade de 110 (menos de cinco células móveis); células progressivas correspondendo a uma velocidade média de percurso (VAP) maior que $50 \mu\text{/s}$ e retilinearidade (STR) maior que 75%; espermatozoides com VAP maior que $20 \mu\text{/s}$ foram considerados móveis; intensidade de células estáticas mínimo de 0,68 e máximo de 1,74; tamanho de células estáticas

mínimo de 0,59 e máximo de 2,99; e alongamento de células estáticas mínimo de 12 e máximo de 97.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: Motilidade Total (%), Motilidade Progressiva (%); Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), Velocidade Curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, μm), Frequência de Batimentos (BCF, Hz), Retilinearidade (STR, %) e Linearidade (LIN, %). Adicionalmente, os espermatozoides foram divididos em quatro grupos baseando-se na velocidade de movimento, que consistiu: Rápidos (RAP, $VAP > 50 \mu\text{m/s}$; %), Médios (MED, $20 \mu\text{m/s} < VAP < 50 \mu\text{m/s}$; %) e Lentos (SLOW; $VAP < 20 \mu\text{m/s}$; %) e espermatozoides imóveis (STATIC; %) (Figura 3).

Figura 3: Manual das análises setup para equinos do CASA; Hamilton Thorne, Ceros 12.3.

Analysis Setup



Fonte: (Manual CASA., 2017)

5.8.2. Avaliação da função espermática

5.8.2.1. Integridade da membrana plasmática

Para a realização dessa técnica, uma alíquota de sêmen (5 μ L) foi misturada ao corante Eosina/Nigrosina, na proporção de 1:1, e 30 segundos após este procedimento foram realizados esfregaços sobre lâminas de microscopia. Após a secagem, as lâminas foram analisadas em microscópio convencional sob magnificação de 1000 vezes, em óleo de imersão. As células foram classificadas em íntegras (não coradas) e não-íntegras (coradas em rosa).

5.8.2.2. Integridade de membrana acrossomal

Para a realização desta técnica, uma alíquota de cada amostra (5 μ L) foi adicionada ao corante fast green – rosa bengala (5 μ L), sendo a mistura incubada durante 60 segundos em mesa aquecida à 37°C. Após a incubação, foram feitos esfregaços sobre lâminas de microscopia. Os esfregaços foram analisados em microscópio convencional sob magnificação de 1000 vezes. Foram contadas 100 células por lâmina, classificadas como:

- Acrossomo Íntegro: região acrossomal de coloração lilás à roxa, levemente mais escura que a região pós-acrossomal;
- Acrossomo Não-íntegro: região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara que a região pós-acrossomal.

5.8.2.3. Atividade mitocondrial

Segundo Hrudka (1987), a enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético

das células, além disso, é pré-requisito para as funções osmótica e sintética, motilidade e manutenção da estrutura celular. A técnica citoquímica desenvolvida por este autor é baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, através de uma reação em cadeia na qual o reagente é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, se restringe à mitocôndria. Esta deposição pode ser identificada através de microscopia convencional pela sua coloração marrom. Desta maneira, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos aos que os espermatozoides são submetidos.

Para realização desta técnica, uma alíquota de 20 μ L de amostra foi incubada com 20 μ L de DAB (1mg/mL de PBS), a 37°C, por uma hora. Após incubação, foram feitos esfregaços em lâminas de microscopia de vidro e estas fixadas em formol a 10% por 10 minutos. As lâminas foram então lavadas e secas sob proteção da luz. Desta maneira, as lâminas foram observadas em microscópio com contraste de fases, sob magnificação de 1000 vezes, sob óleo de imersão. Foram contados 100 espermatozoides por lâmina e classificados de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em 4 classes:

- Classe I: espermatozoides com peça intermediária totalmente corada indicando alta atividade mitocondrial (DAB I);
- Classe II: espermatozoides com mais de 50% dos segmentos corados (ativos) indicando atividade mitocondrial intermediária (DAB II);
- Classe III: espermatozoides com menos de 50% dos segmentos corados (ativos) indicando baixa atividade mitocondrial (DAB III);
- Classe IV: espermatozoides com peça intermediária não corada indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV).

5.8.2.4. Avaliação por citometria de fluxo

Todos os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a capacidade fertilizante do espermatozoide. Dentre estes, a técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar a integridade estrutural ou

funcionalidade de forma clara (CELEGHINI et al., 2005), além de possibilitar a avaliação de vários compartimentos celulares ao mesmo tempo (CELEGHINI et al., 2007).

As avaliações dos atributos espermáticos foram realizados por meio da técnica de citometria de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System (Guava® Technologies, Hayward, CA, E.U.A.). Foram avaliadas a integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).

5.8.2.5. Integridade das membranas plasmática e acrossomal

A integridade da membrana plasmática e a integridade da membrana acrossomal foram avaliadas por iodeto de propídio (PI) (50 µg/mL; P-4170, Sigma-Aldrich) e aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA) (G7462, Promega), respectivamente. Esta associação divide as populações de espermatozoides em quatro grupos: membrana intacta e acrossoma intacto (IMIA), membrana intacta e acrossoma danificado (IMDA), membrana danificada e acrossoma intacto (DMIA), membrana danificada e acrossoma danificado (DMDA). O procedimento foi realizado com 200.000 células diluídas em SP-Talp, coradas com PI (0,5 mg / ml em NaCl 0,9%) e FITCPSA (FITC-PSA L-0770, Sigma, 100 µg / mL em solução de azida de sódio a 10% em DPBS). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo após 10 min, excitadas a 488 nm e detectadas a 630-650 nm (PI) e 515-530 nm (FITC).

Foram classificadas em quatro classes: ALMI (acrossomo lesado e membrana plasmática íntegra), ALML (acrossomo lesado e membrana plasmática lesada), AIML (acrossomo íntegro e membrana plasmática lesada), AIMI (acrossomo íntegro e membrana plasmática íntegra).

5.8.2.6. Potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por meio da sonda fluorescente metacromática JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6'-tetrachloro-1,1', 3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), (Invitrogen, Eugene, OR, USA). Emitem fluorescência verde em baixo (LMP) e médio (MMP) potência mitocondrial ou fluorescência vermelho-laranja em alto potencial (HMP). O procedimento foi realizado com 200.000 células diluídas em SP-Talp e coradas com JC-1 (76,5 μ M em DMSO). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo após 10 min, excitadas a 488 nm e detectadas a 590 nm.

Foram classificadas em três classes: JCA (alto potencial de membrana mitocondrial), JCB (baixo potencial de membrana mitocondrial), JCI (potencial intermediário).

5.8.2.7. Avaliação do *Status Oxidativo*

A Cell-ROX verde (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) é uma sonda fluorescente que penetra na célula e, quando oxidado por radicais livres intracelulares, liga-se ao DNA, emitindo uma fluorescência verde mais intensa. Para este ensaio, 187.500 células foram coradas com CellROX verde (concentração final de 5 μ M) durante 30 minutos a 37°C e, nos últimos 10 minutos, adicionou-se PI a uma concentração final de 6 μ M. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo, excitadas a 488nm, e detectadas a 630-650nm (PI) e 515-530nm (CellROX verde).

Foram classificadas em quatro classes: EOPMI (espécies reativas de oxigênio positiva e integridade membrana plasmática), EOPML (espécies reativas de oxigênio positiva com alteração de membrana plasmática), EONML (espécies reativas de oxigênio negativa com alteração de membrana plasmática), EONMI (espécies reativas de oxigênio negativa com integridade de membrana).

5.8.2.8. Ensaio da estrutura da cromatina do espermatozoide (SCSA)

Para a avaliação do SCSA, foi utilizada metodologia proposta por Evenson et al. (1999). O procedimento foi realizado com 200.000 células. As amostras foram incubadas em banho-maria durante 30 segundos a 37°C foram diluídas em tampão TNE (Tris-HCL 0,01mol/L, NaCl 0,15mol/L, EDTA 1 mmol/L e água destilada, pH 7,4) e detergente ácido (HCL 0,08mol/L, NaCl 0,015mol/L, Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 1,2). Depois de 30 segundos, a solução de Acridine Orange (158550, Sigma-Aldrich) (AO) foi adicionada (ácido cítrico 0,1 mol/L; Na₂HPO₄ 0,2mol/L; EDTA 0,001 mol/L; NaCl 0,15mol/L, AO foi incubado com 6µg/mL em água destilada pH 6,0), e cada amostra foi analisada utilizando citometria de fluxo Guava EasyCyte®, depois de 5 minutos de incubação a 37°C, com excitação de 488nm e detectada em 630-650nm (vermelho) e 515-530nm (verde).

5.9. Avaliação da susceptibilidade à peroxidação lipídica (TBARS)

A avaliação da susceptibilidade à peroxidação lipídica das amostras refrigeradas e criopreservadas foi realizada pelo ensaio desenvolvido por Ohkawa et al., (1979) e adaptado por Nichi et al.(2006), denominado Ensaio TBARS. Nesta abordagem é realizada a indução do radical hidroxil juntamente à amostra seminal, por meio da adição de sulfato de ferro e ácido ascórbico para avaliar a susceptibilidade destas amostras à peroxidação lipídica.

Para realizar esta técnica, 200µL de cada amostra foi incubada junto à 50µL de ácido ascórbico (20mM) e 50µL de sulfato de ferro durante 90 minutos a 37°C. Após a incubação, 600µL de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%) foi adicionado à amostra, que foi centrifugada a 28000G durante 15 minutos a 5°C. Após este procedimento 800µL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%). Este composto por sua vez foi incubado à 90°C durante 15 minutos para que ocorra a reação entre o TBA e os produtos da peroxidação lipídica. Imediatamente após esta incubação a amostra foi imersa em gelo para inibir tal reação.

Após ocorrer a peroxidação lipídica das amostras decorrente de um estresse oxidativo induzido, ocorrerá a formação de alguns produtos que são consequência desta peroxidação, sendo o malondealdeído o principal produto formado (NICHI et al., 2006). Ao adicionar o TBA na amostra, este ácido reage com o malondealdeído formando coloração rósea. Esta coloração rósea das amostras foi quantificada em um espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences) com o comprimento de onda de 532 nanômetros. Sendo assim a avaliação da susceptibilidade à peroxidação lipídica foi expressa em nanogramas de TBARS/10⁶ espermatozoides.

Este ensaio também foi utilizado para avaliar a peroxidação lipídica do plasma seminal. No entanto, o ensaio foi realizado na ausência de indução da peroxidação lipídica. Portanto, foi mensurada a peroxidação lipídica real do plasma seminal de cada ejaculado e, os resultados foram expressos em nanogramas (ng) de TBARS por mL.

5.10. Teste de ELISA

Uma das técnicas sorológicas bastante utilizadas é o ensaio imunoenzimático (EIE) ou “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) que possui um alto nível de sensibilidade e reprodutibilidade e permite automação e tornou-se um método de eleição para exame de um grande número de amostras. Têm-se vários tipos de ELISA, como o direto, indireto, duplo sanduíche direto e o ELISA duplo sanduíche indireto. As vantagens do ELISA são: estabilidade e o pequeno volume de reagentes possibilitam rápida execução diagnóstica, apresenta baixo nível de risco biológico (TIZARD, 1998). Uma das principais desvantagens desta técnica é o alto custo de aquisição de kit para realização do ELISA, em virtude disto alguns laboratórios produzem e padronizam seu próprio material (ESTEVEZ, 2007).

O ELISA duplo sanduíche é utilizado para detectar antígenos. Envolve primeiramente o revestimento de placas de poliestireno com anticorpos de captura. Acrescenta-se então a solução de antígenos, de forma que o antígeno se conjugue com o anticorpo de captura. Isso é seguido, após uma lavagem,

pela adição de um anticorpo específico, uma antiglobulina marcada com enzima e um substrato. Neste teste, a intensidade da reação de cor se relaciona diretamente com a quantidade de antígeno conjugado (TIZARD, 1998).

O termo validação vem do latim *valere* que significa “ter força”. Para um método “ter força” o estudo de validação deve envolver a confiabilidade e a relevância do novo método (BALLS et al., 1990). Entretanto, o conceito de validação é considerado confuso e, dependendo do contexto ou da interpretação dos autores pode levar a diferentes conclusões (METZ et al., 2002).

Um ensaio imunológico só pode ser considerado totalmente otimizado após minucioso estudo dos efeitos exercidos por alguns parâmetros físico-químicos sobre o seu funcionamento. O aspecto mais importante, é que estes efeitos podem ser minimizados, ou eliminados, obtendo-se ensaios com ótima sensibilidade. Durante a padronização do ELISA, foram seguidas as determinações do fabricante com o intuito de realizar o controle de qualidade e a replicabilidade do teste. No presente experimento foram realizados ensaios com amostras de diferentes procedências sabidamente de garanhões bons e maus refrigeradores e congeladores. As amostras foram testadas em duplicatas, sendo que os resultados foram expressos em nanogramas por mL (ng/mL). Para validar o kit de ELISA para as amostras do plasma seminal de equinos foi realizado o teste de paralelismo.

5.11. Padronização da carnosina pelo kit de ELISA

5.11.1. Teste de paralelismo

No teste de paralelismo avaliou-se a amostra do plasma seminal reage da mesma forma com o anticorpo do padrão do kit. O teste determina se as amostras estão diluídas ou não e possibilita saber com qual diluição trabalhar nas amostras.

Para a realização desse teste utilizamos uma amostra altamente concentrada, em seguida foram realizadas diluições seriadas para que fosse possível traçar uma curva paralela à curva padrão do kit para comparar com os níveis conhecidos do padrão do kit, as duas curvas (amostra e kit) precisam estar paralelas dessa forma sabe-se que o anticorpo do plasma seminal equino reage da mesma forma com a carnosina do padrão do kit, sem diferença de inclinação. O intuito era avaliar se há ou não a interferência da matriz na ligação antígeno – anticorpo.

5.11.2. Quantificação da carnosina pelo método de ELISA

As dosagens de carnosina foram realizadas por método ELISA utilizando kits comerciais fornecidos pela Biomatik® contendo 96 poços – (EKU02967) Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Carnosine – (<http://www.biomatik.com/media/productdocs/EKU02967-PI.pdf>). O processamento das amostras analisadas por meio dos kits foi realizado as instruções segundo a recomendação do fabricante.

As amostras do plasma seminal que estavam armazenadas a -80° graus foram descongeladas em temperatura ambiente e em seguida foram centrifugadas a 600G durante 10 minutos uma vez, para retirar qualquer precipitado que houvesse na amostras trocando sempre o tubo, então foram mensuradas. O método utilizado será ELISA duplo sanduíche.

5.11.3. Preparação dos reagentes do kit de ELISA

Todos os componentes do kit e amostras foram colocadas na bancada em temperatura ambiente (18-25°C) antes do uso, para o preparo do padrão foi pipetado 1,0 ml de diluente do padrão em um tubo de ensaio, e mantido por 10 minutos em temperatura ambiente. A concentração do padrão na solução estoque é 900ng/mL.

Foram preparados cinco tubos contendo 0,6mL do diluente do padrão e então foi realizada uma série de diluições sempre homogeneizando cada tubo antes da próxima transferência, então foram realizados os cinco padrões diluídos em: 900ng/mL, 300ng/mL, 100ng/mL, 33.33ng/mL, 11.11ng/mL, e os últimos tubos com diluente do padrão que é o branco com 0ng / mL.

As soluções de detecção do reagente A e B foram centrifugadas antes da utilização das mesmas, em seguida foram diluídas até a concentração de trabalho com diluente de ensaio A e B, respectivamente (1: 100).

Para o preparo da solução de lavagem, diluiu-se 20 mL da solução de lavagem concentrada (30X) em uma proveta com 580 mL de água destilada para preparar 600 mL da solução de lavagem (1X).

O Substrato TMB foi aspirado na dosagem necessária da solução com ponteiros esterilizados.

5.11.4. Procedimento de ensaio

Foram determinados poços para diluir o padrão, o branco e a amostra. Preparou-se os cinco poços para colocar os padrões e um para o branco, então foi adicionado 50µL de cada uma das diluições dos padrões, do branco e das amostras nos poços, respectivamente. Em seguida foi adicionado 50µL de detecção do reagente A em cada poço imediatamente, então foi agitada a placa usando um agitador de micro placas e incubado durante uma hora a 37°C, após esse tempo, a placa foi aspirada e lavada três vezes cada poços com a solução de lavagem com 350µL usando a WELLWASH 4 MK 2 (THERMO ELECTRON CORPORATION®).

Após esse procedimento foi adicionado 100 µL da solução do reagente de detecção B em cada poço, a placa foi vedada com um adesivo de proteção e incubada por 30 minutos a 37°C. O processo de lavagem e aspiração foi repetido em um total de cinco vezes.

Após adicionou-se 90µL da solução do substrato em cada poço e então a placa foi protegida com estojo de vedação para proteção da luz e incubado durante 15 minutos a 37°C. Observou-se que o líquido ficou azul pela adição

da solução do substrato. Para a realização da parada da reação foi adicionado 50 µL da solução de parada de reação observando a coloração mudar para amarelo, imediatamente, o leitor de micro placas MILTISKAN EX (THERMO ELECTRON CORPORATION®) realizou as medições a 450 nm.

5.11.5. Delineamento experimental

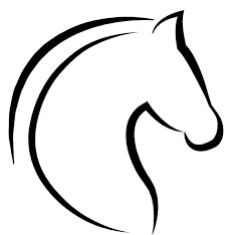
No presente experimento, 40 ejaculados equinos obtidos em duplicata (N=8). Cada amostra seminal foi dividida em duas alíquotas, uma destinada à refrigeração espermática e a remanescente submetida ao processo de criopreservação espermática.

Após 24 horas, as amostras refrigeradas foram submetidas às análises espermáticas e classificadas em alta e baixa tolerância à refrigeração de acordo com suas motilidades totais superiores ou inferiores a 50%, respectivamente. Esta classificação foi adaptada de Brinsko e colaboradores (2000). Da mesma forma, as amostras seminais criopreservadas foram descongeladas, submetidas às análises espermáticas e classificadas em alta e baixa tolerância à criopreservação de acordo com suas motilidades totais superiores ou inferiores a 30%, respectivamente, de acordo com o manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Os grupos de alta e baixa tolerância à refrigeração e criopreservação foram submetidas às análises de cinética espermática, testes funcionais das estruturas celulares, avaliação do status oxidativo e mensuração das concentrações de carnosina no plasma seminal. Adicionalmente, dividimos as amostras seminais quanto às suas concentrações de carnosina em quatro grupos: alta (1), média – alta (2), média – baixa (3) e baixa (4).

5.12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do programa SAS System for Windows. Esta foi conduzida por meio do aplicativo Guided Data Analysis, onde os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecerem a estas premissas, serão transformados e, se a normalidade não for obtida, empregará-se então, uma análise não paramétrica (Teste de Wilcoxon). Para dados paramétricos foi utilizado o teste de t Student. Além disso, a comparação entre as concentrações de carnosina foi realizada por meio de uma análise de variância (ANOVA), utilizando o teste LSD. O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) será de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerar-se-á que houve um efeito significativo.



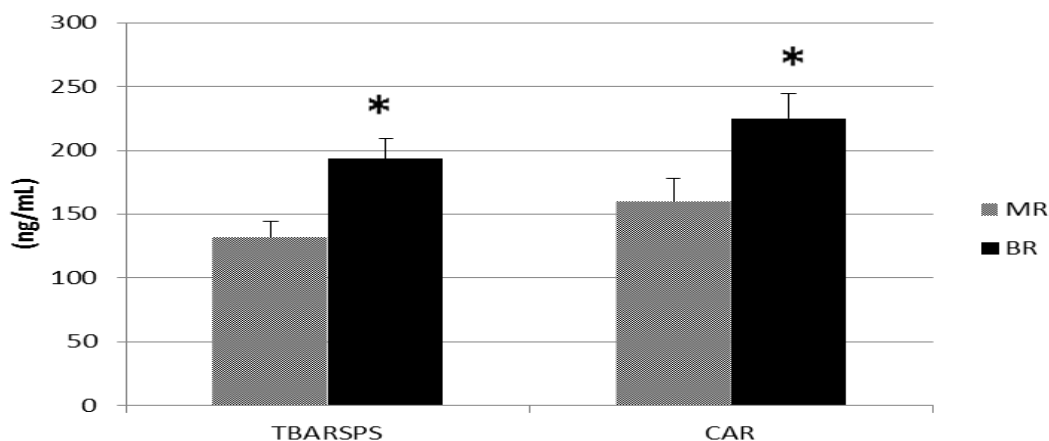
RESULTADOS

6. RESULTADOS

No presente experimento, foram comparadas as funções das estruturas espermáticas, padrões do movimento espermático, *status* oxidativo e concentrações de carnosina entre amostras seminais com alta e baixa tolerância à refrigeração (bons ou maus refrigeradores) e criopreservação espermática (bons ou maus congeladores). Além disso, dividimos as amostras espermáticas quanto às suas respectivas concentrações de carnosina (1 = alta, 2 = média - alta, 3= média – baixa e 4 = baixa) e avaliamos o efeito das concentrações de carnosina na funcionalidade e homeostase oxidativa espermática.

Em relação ao efeito da refrigerabilidade no *status* oxidativo e nas concentrações de carnosina, verificamos maiores concentrações desta proteína em amostras seminais com alta resistência à refrigeração e maior concentração de malondialdeído no plasma seminal (TBARSPS; Figura 4). Além disso, este mesmo grupo apresentou maior produção de espécies reativas de oxigênio e integridade de membrana (EOPMI). Além disso, a carnosina apresentou correlação positiva com o aumento do *status* oxidativo do plasma seminal TBARSPS ($r= 0,59264$; $p= <0, 0001$). Os níveis de MDA, por sua vez, apresentou correlação negativa com a porcentagem de células estáticas ($r= -0,375$; $p= 0,0157$) e correlação positiva com as células rápidas (RAPID; $r= 0,30902$; $p= 0,0493$).

Figura 4 - Efeito da refrigeração (MR: má refrigeração, BR: boa refrigeração) na detecção do *status* oxidativo do plasma seminal (TBARSPS) e das concentrações de carnosina (CAR) do plasma seminal – São Paulo – 2017

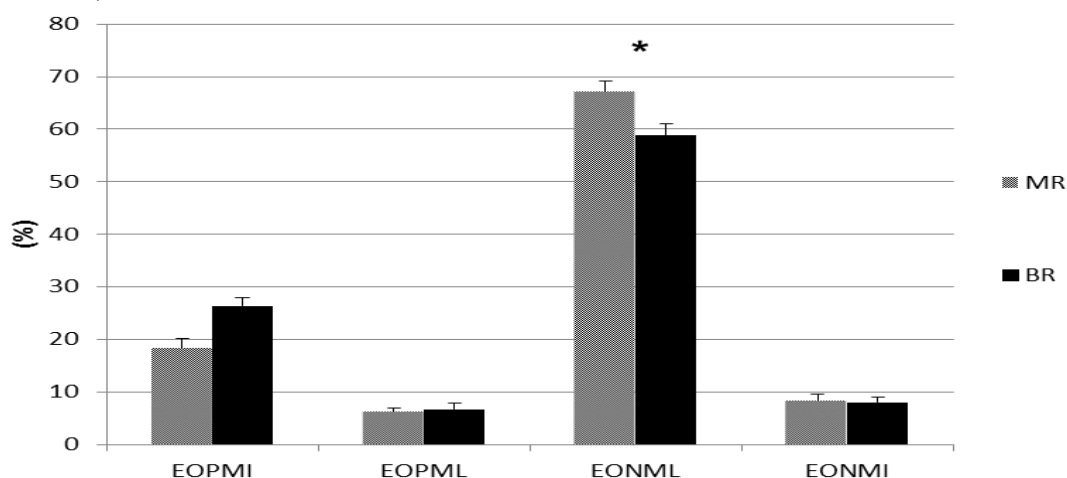


* Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Por outro lado, amostras seminais com baixa tolerância à refrigeração apresentaram redução na produção de EROs e integridade de membrana plasmática (Figura 5). Além disso, as células com espécies reativas de oxigênio e integridade de membrana (EOPMI) correlacionaram positivamente com as células acrossomo íntegro e membrana íntegra (AIMI; $r = 0,53064$; $p = 0,0006$) e alto potencial de membrana mitocondrial (JCA; $r = 0,50619$; $p = 0,0009$).

Figura 5 - Efeito da refrigeração (MR: má refrigeração, BR: boa refrigeração) na detecção de espécies reativas de oxigênio e na integridade de membrana plasmática (EOPMI: espécies reativas de oxigênio positiva e integridade de membrana; EOPML: espécies reativas de oxigênio positiva e alteração de membrana; EONML: espécies reativas de oxigênio negativa e alteração de membrana; EONMI: espécies reativas de oxigênio negativa e integridade de membrana) – São Paulo – 2017

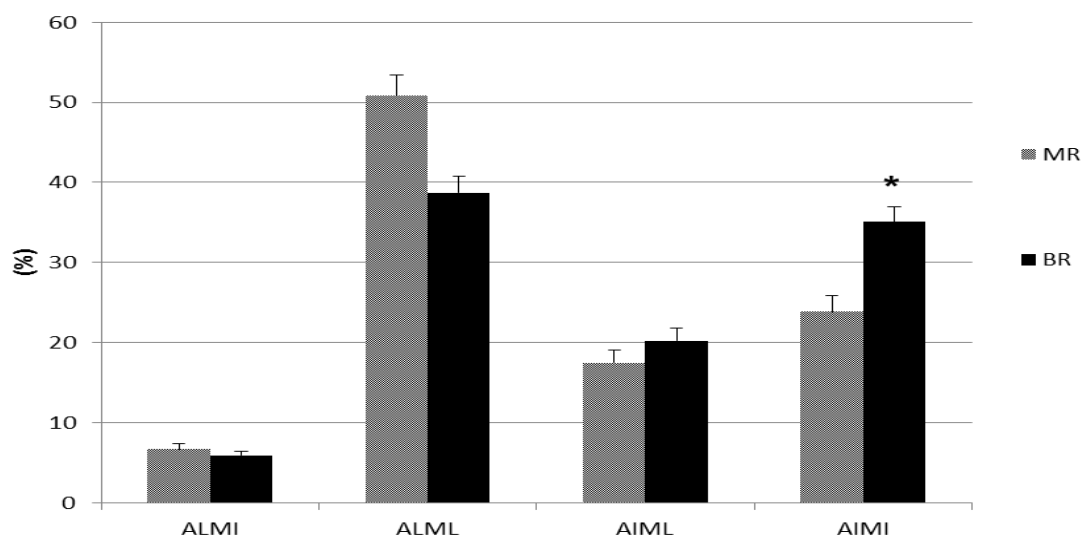


* Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

No que diz respeito às estruturas espermáticas, no grupo de amostras seminais provenientes de garanhões maus refrigeradores, observamos aumento na porcentagem de células com alteração de permeabilidade de membrana e lesão acrossomal (ALML; Figura 6) e baixa atividade mitocondrial (Figura 7). Adicionalmente, observamos correlação negativa entre alta atividade mitocondrial (DABI) e acrossomo lesado e membrana lesada (ALML; $r = -0,39216$; $p = 0,0149$). A variável DABI, por sua vez, apresentou correlação positiva com a motilidade total (MOTILE; $r = 0,34102$; $p = 0,0291$).

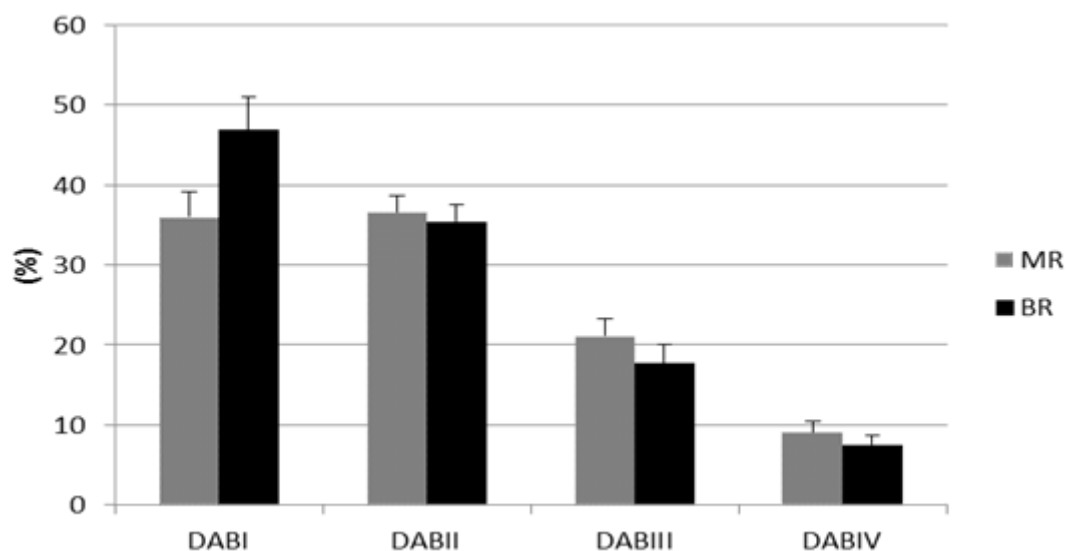
Figura 6 - Efeito da refrigeração (MR: má refrigeração, BR: boa refrigeração) na integridade das membranas plasmática e acrossomal (ALMI: acrossomo lesado e membrana plasmática íntegra, ALML: acrossomo lesado e membrana plasmática lesada, AIML: acrossomo íntegro e membrana plasmática lesada, AIMI: acrossomo íntegro e membrana plasmática íntegra) – São Paulo – 2017



* Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Figura 7 - Efeito da refrigeração (MR: má refrigeração, BR: boa refrigeração) nas atividades mitocondrial alta (DABI), média (DABII), baixa (DABIII) e nula (DABIV) – São Paulo – 2017

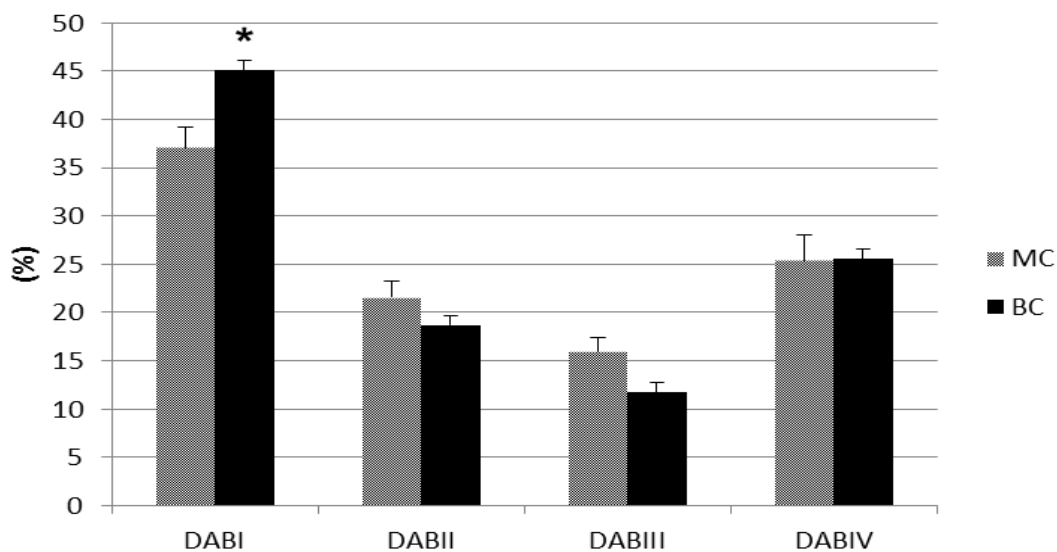


* Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Em relação ao efeito da congelabilidade nos atributos espermáticos e no *status* oxidativo seminal, observamos no grupo de amostras seminais pertencentes aos bons congeladores aumento na porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (Eosina-Nigrosina), alta atividade mitocondrial (DABI, Figura 8) e alto potencial de membrana mitocondrial (JCA, Figura 9). Ademais, a variável alto potencial de membrana mitocondrial (JCA) correlacionou-se positivamente com integridade de membrana plasmática e acrossomo íntegro (AIMI; $r = 0,41736$, $p = 0,0102$). Por outro lado, esta variável apresentou correlação negativa com a baixa atividade mitocondrial (DABIII; $r = -0,2806$; $p = 0,0795$).

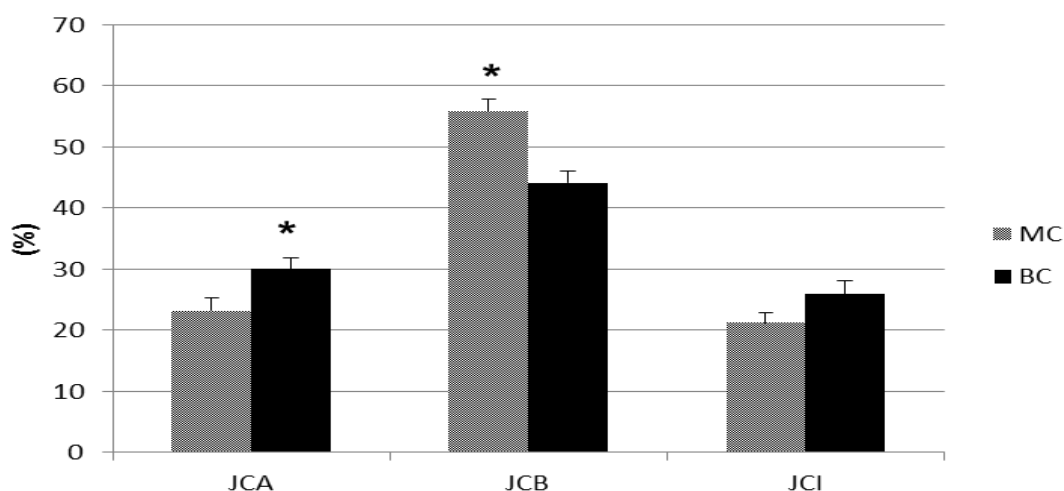
Figura 8 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) nas atividades mitocondrial alta (DABI), média (DABII), baixa (DABIII) e nula (DABIV) – São Paulo – 2017



* Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Figura 9 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) nos potenciais de membrana mitocondrial alto (JCA), intermediário (JCI), baixo (JCB) - São Paulo - 2017



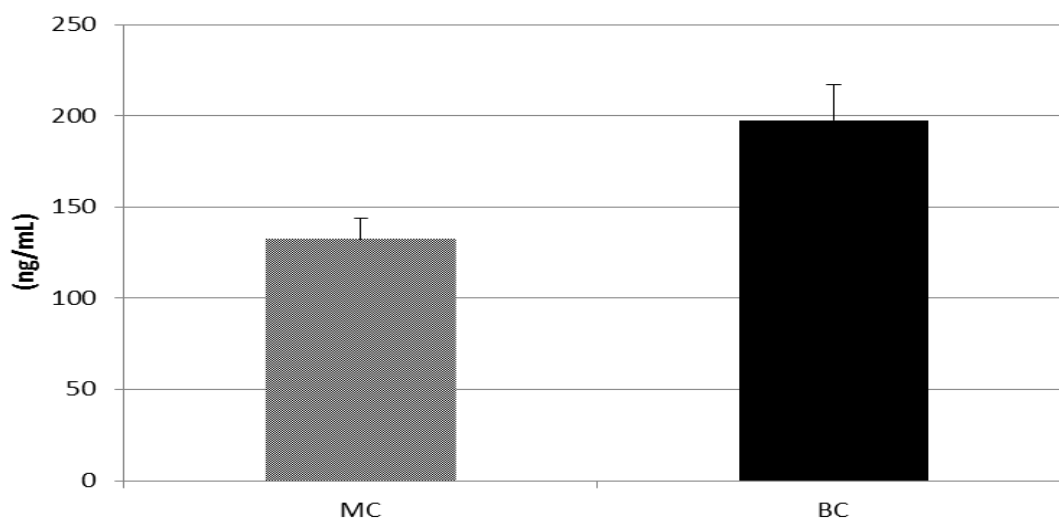
* Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Além disso, observamos neste grupo maior peroxidação lipídica do plasma seminal (TBARSPS, Figura 10) e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e alteração de permeabilidade da membrana plasmática (EOPML, Figura 11). No grupo de amostras seminais de baixa congelabilidade, a carnosina apresentou correlação positiva com o estresse oxidativo do plasma

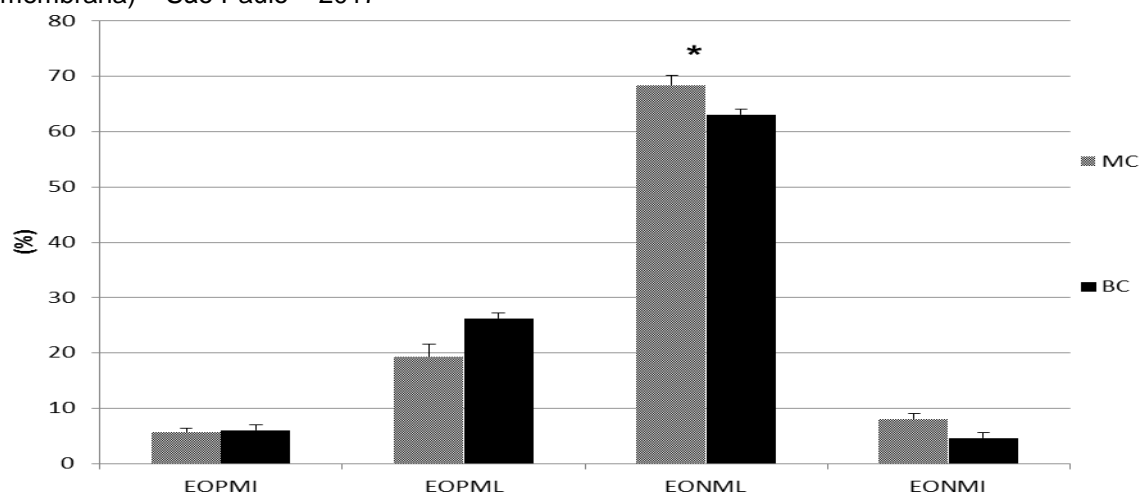
seminal (TBARSPS; $r= 0,6091$; $p= <0,0001$), este resultado sugere que, neste grupo houve um maior índice de peroxidação lipídica, provavelmente devido a uma maior produção de EROs no plasma seminal e a carnosina não foi suficiente para combater os danos do estresse oxidativo. Por outro lado, a baixa atividade mitocondrial (DABIII) apresentou correlação negativa com a motilidade total (MOTILE; $r= -0,566$; $p=0,0003$).

Figura 10 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) na avaliação do status oxidativo do plasma seminal (TBARSPS) – São Paulo – 2017



Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Figura 11 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) na detecção de espécies reativas de oxigênio e na integridade de membrana plasmática (EOPMI: espécies reativas de oxigênio positiva e integridade de membrana; EOPML: espécies reativas de oxigênio positiva e alteração de membrana; EONML: espécies reativas de oxigênio negativa e alteração de membrana; EONMI: espécies reativas de oxigênio negativa e integridade de membrana) – São Paulo – 2017

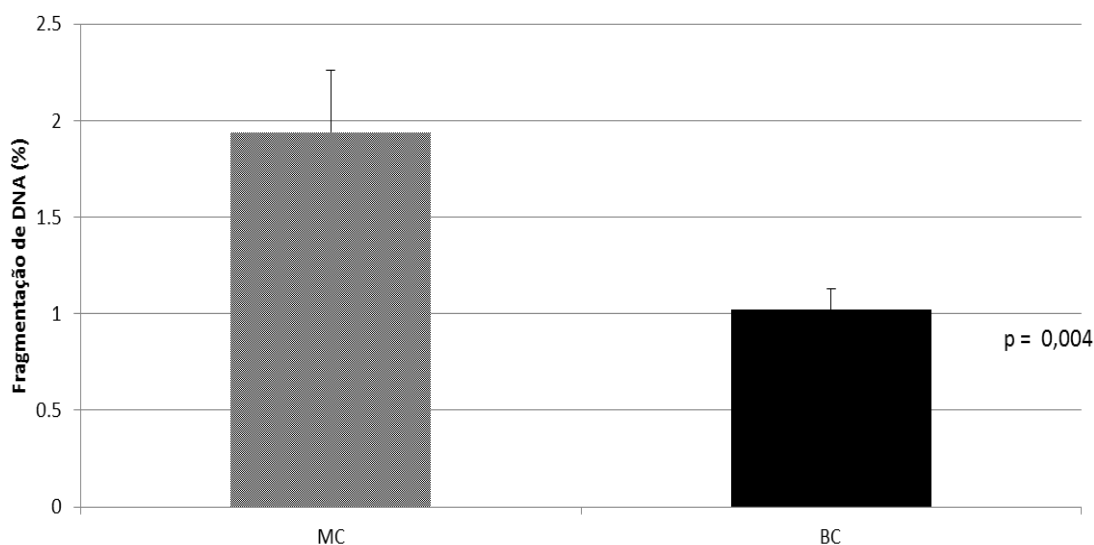


* Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

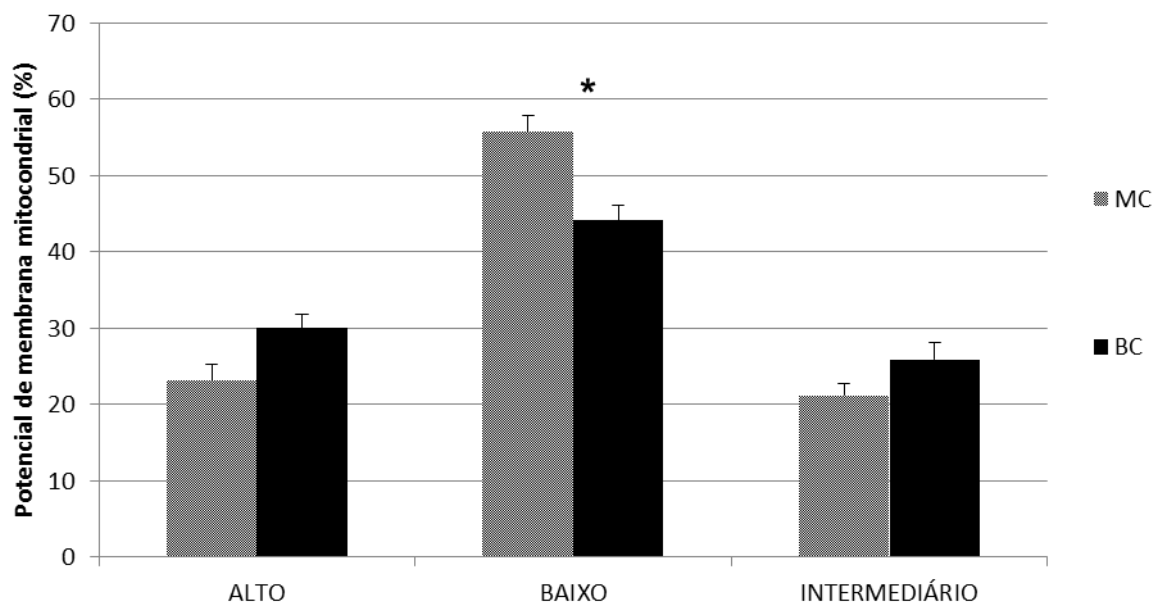
Amostras seminais de baixa congelabilidade apresentaram maior susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida (SCSA, Figura 12), maior porcentagem de células com baixo potencial de membrana mitocondrial (JCB, Figura 13) e aumento na integridade de membrana plasmática e lesão acrossomal (ALMI, Figura 14). Além disso, a susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida (SCSA) apresentou correlação positiva com baixa atividade mitocondrial (DABIII; $r = 0,5155$; $p = 0,0007$). Ainda neste grupo, o TBARS apresentou correlação positiva com o (SCSA; $r = 0,3893$; $p = 0,0119$), e correlação negativa com a produção de espécies reativas de oxigênio e alteração de permeabilidade da membrana plasmática (EOPML; $r = -0,5604$; $p = 0,0003$), alteração de membrana plasmática e lesão acrossomal (ALML; $r = -0,3777$; $p = 0,0163$), motilidade total (MOTILE; $r = -0,3321$; $p = 0,0317$) e motilidade progressiva (PROGRESSIVE; $r = -0,3164$; $p = 0,0412$).

Figura 12 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) na fragmentação de DNA – São Paulo – 2017



Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

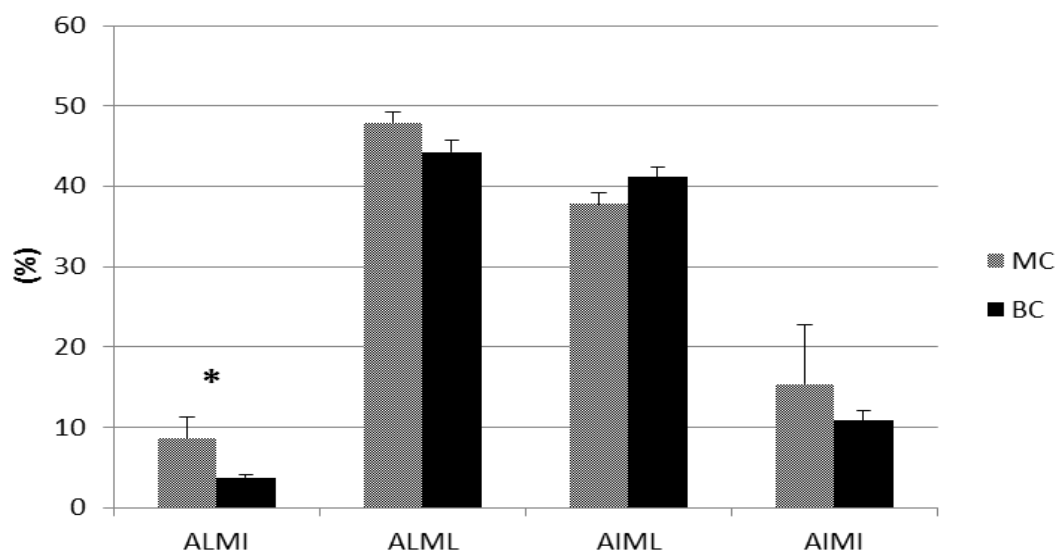
Figura 13 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) nos potenciais de membrana mitocondrial alto (JCA), intermediário (JCI), baixo (JCB) - São Paulo - 2017



* Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Figura 14 - Efeito da congelação (MC: má congelação, BC: boa congelação) na integridade das membranas plasmática e acrossomal (ALMI: acrossomo lesado e membrana plasmática íntegra, ALML: acrossomo lesado e membrana plasmática lesada, AIML: acrossomo íntegro e membrana plasmática lesada, AIMI: acrossomo íntegro e membrana plasmática íntegra) – São Paulo – 2017

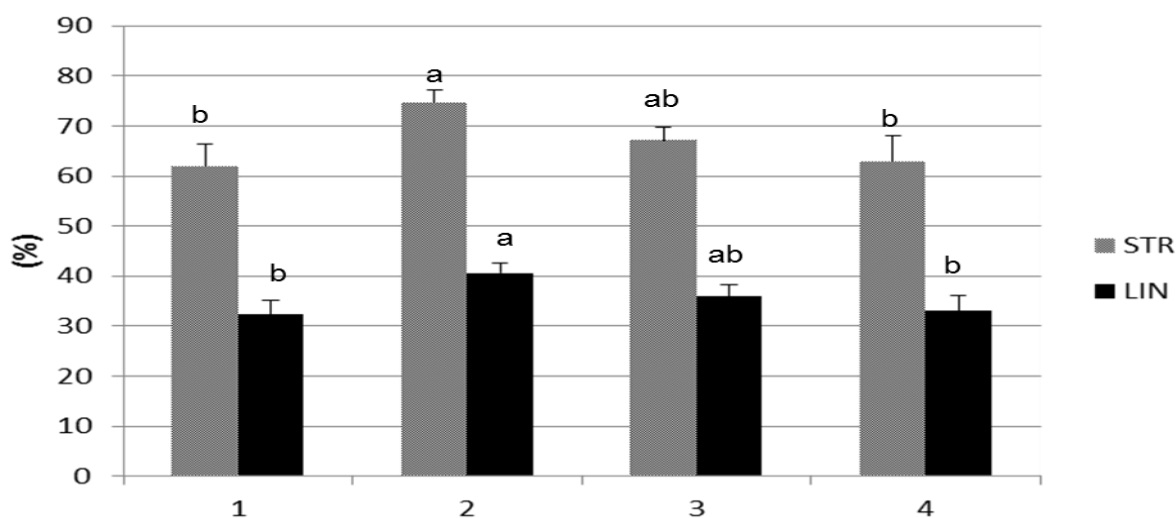


* Indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

No que diz respeito ao efeito das concentrações de carnosina na refrigerabilidade seminal, amostras com concentração média – alta (2) desta proteína apresentaram maior retilinearidade e linearidade em comparação aos grupos que possuem alta (1) e baixa (4) concentrações de carnosina (Figura 15).

Figura 15 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) nas cinéticas espermáticas: retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017

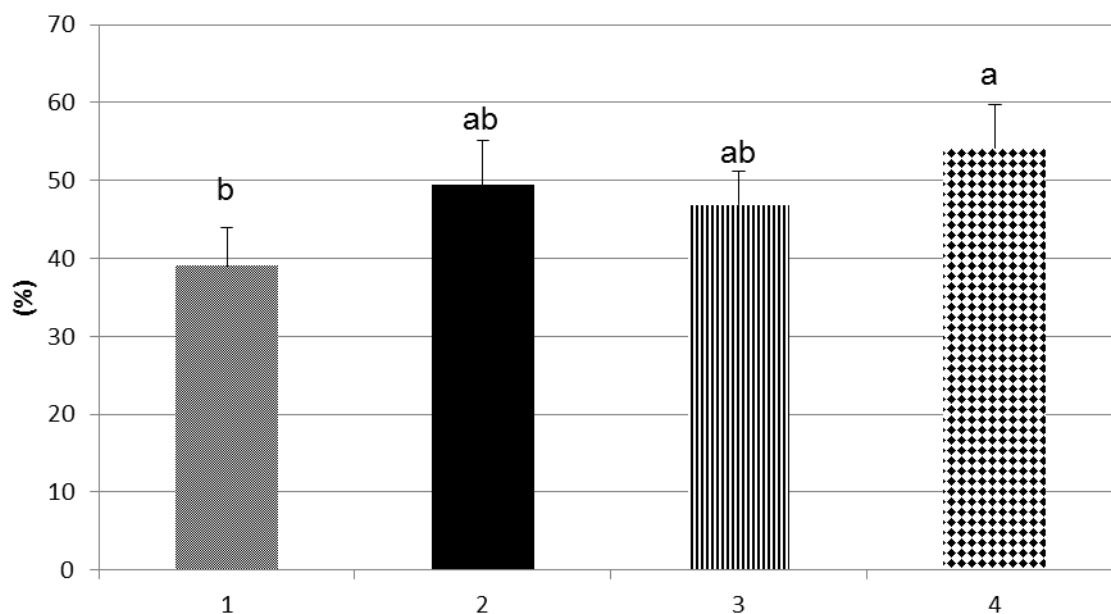


a, b: sobrescritos indicam diferenças entre as concentrações ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Por outro lado, amostras seminais com baixas concentrações de carnosina apresentaram maior porcentagem de células móveis em comparação às que possuem altas concentrações desta proteína (Figura 16).

Figura 16 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na motilidade total (MOTILE) após 24 horas de refrigeração – São Paulo - 2017

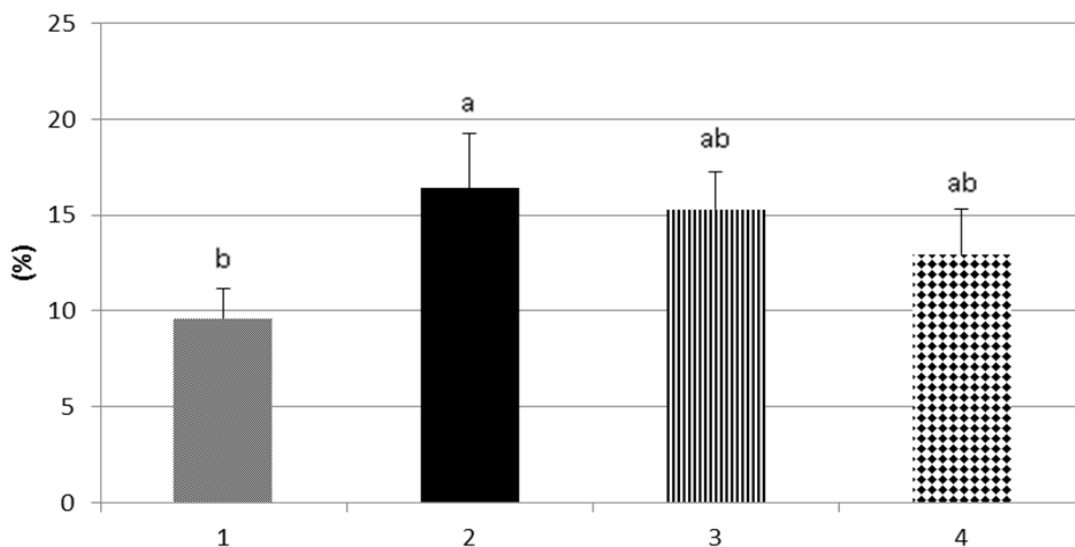


a, b: sobrescritos indicam diferenças entre as concentrações ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Em relação às velocidades espermáticas, observamos maior porcentagem de células com movimento médio (MEDIUM) em amostras espermáticas com concentrações média – alta de carnosina em comparação aos grupos média – baixa e baixa (Figura 17). Além disso, verificamos maior quantidade de células lentas no grupo com concentração da proteína carnosina média – baixa (Figura 18).

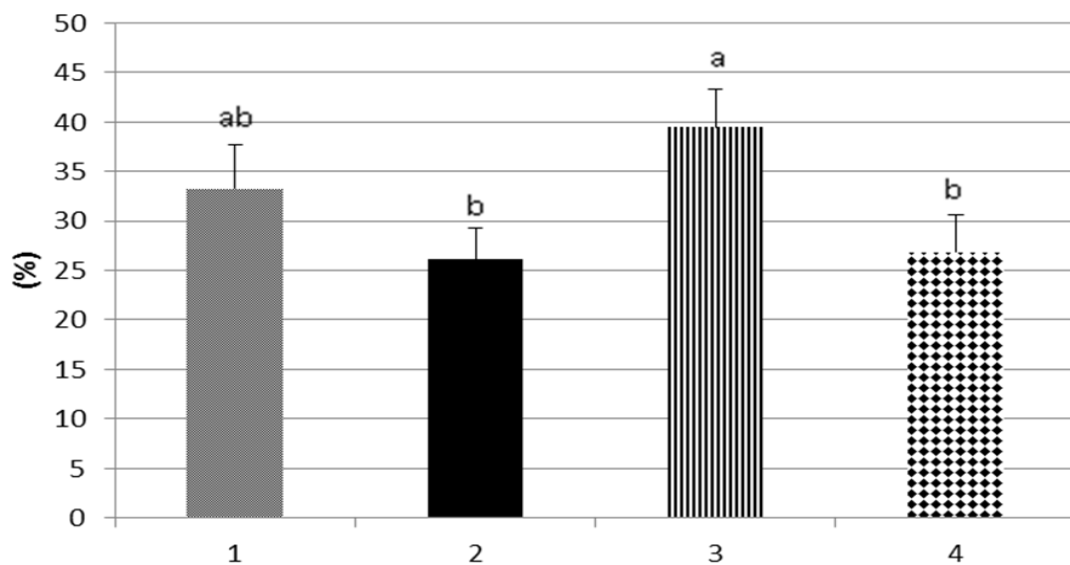
Figura 17 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na velocidade média (MEDIUM) após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017



a, b: sobrescritos indicam diferenças entre as concentrações ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Figura 18 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na velocidade lenta (SLOW) após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017



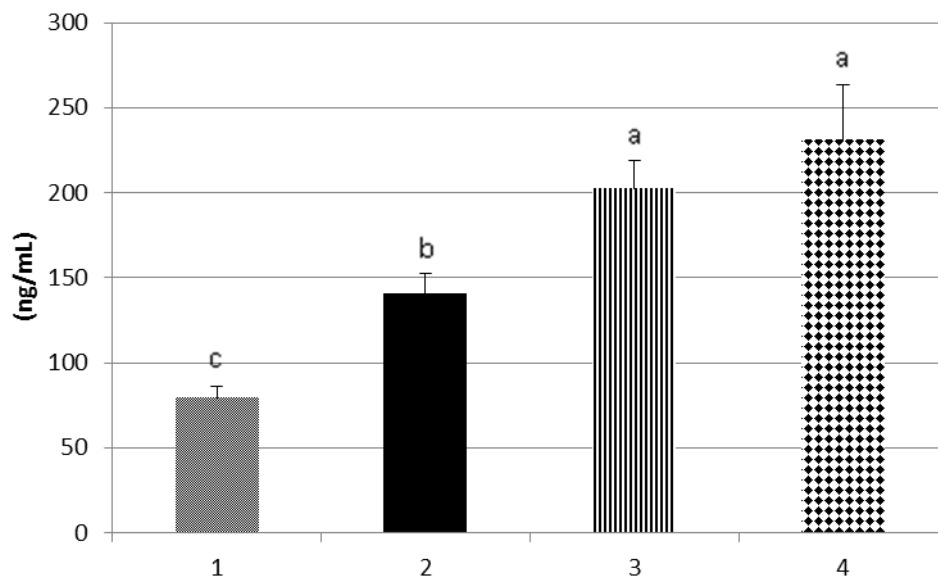
a, b, c: sobrescritos indicam diferenças entre as concentrações ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Observamos que amostras seminais com maiores concentrações de carnosina apresentaram menores concentrações de malondialdeído (MDA, produto da peroxidação lipídica), sendo que as concentrações de MDA

apresentaram um efeito concentração dependente à medida que a concentração de carnosina diminui (Figura 19).

Figura 19 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na avaliação do *status* oxidativo do plasma seminal após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017

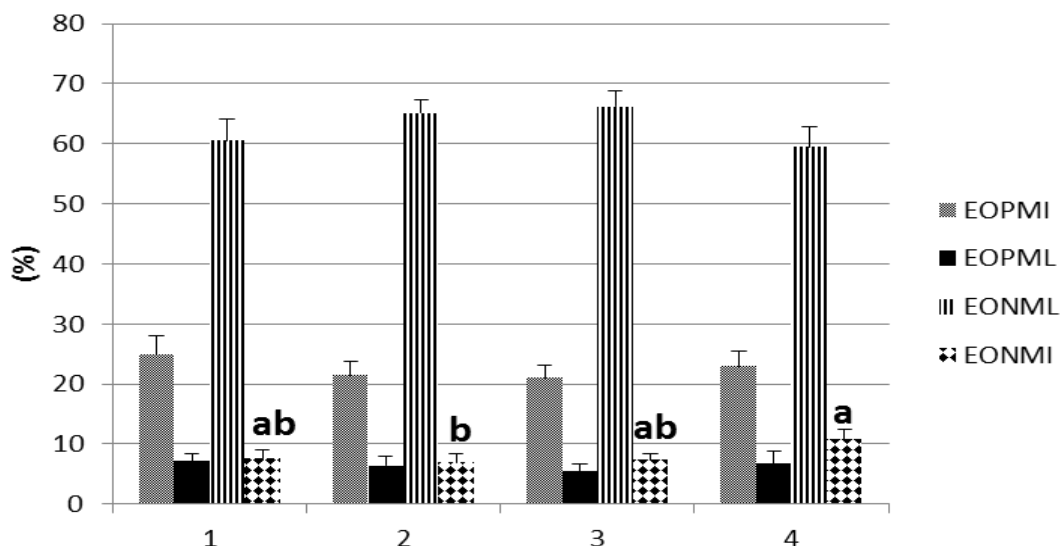


a, b, c: sobrescritos indicam diferenças entre as concentrações ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Por outro lado, amostras que possuíram menores concentrações de carnosina apresentaram menor produção de EROs e maior quantidade de células com membrana plasmática intacta (Figura 20).

Figura 20 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na detecção de espécies reativas de oxigênio e na integridade de membrana plasmática (EOPMI: espécies reativas de oxigênio positiva e integridade de membrana; EOPML: espécies reativas de oxigênio positiva e alteração de membrana; EONML: espécies reativas de oxigênio negativa e alteração de membrana; EONMI: espécies reativas de oxigênio negativa e integridade de membrana) após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017

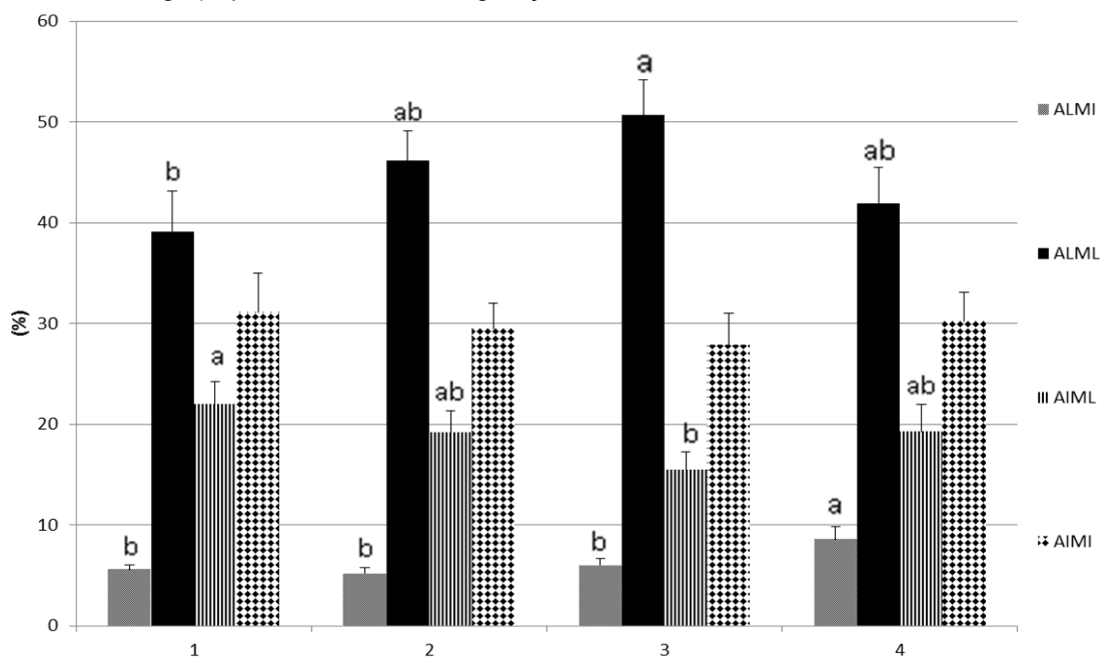


a, b.: sobrescritos indicam diferenças entre as concentrações ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Não detectamos diferenças na porcentagem de células com membrana plasmática e acrossoma íntegros nas diferentes concentrações de carnosina (AIMI). No entanto, verificamos maior porcentagem destas estruturas espermáticas lesadas (ALML) em amostras com concentrações média – baixa em comparação ao grupo carnosina alta (Figura 21).

Figura 21 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na integridade das membranas plasmática e acrossomal (ALMI: acrossomo lesado e membrana plasmática íntegra, ALML: acrossomo lesado e membrana plasmática lesada, AIML: acrossomo íntegro e membrana plasmática lesada, AIMI: acrossomo íntegro e membrana plasmática íntegra) após 24 horas de refrigeração – São Paulo – 2017

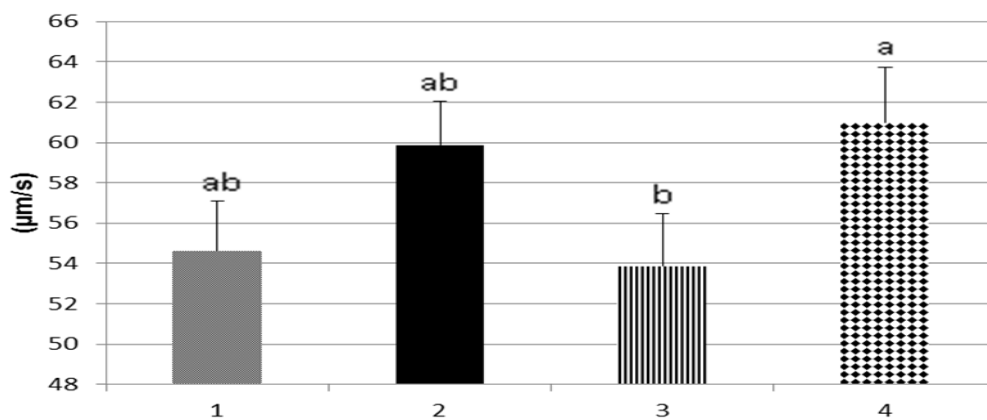


a, b: sobrescritos indicam diferenças entre as concentrações ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Em relação ao efeito das concentrações de carnosina na congelabilidade seminal, observamos maior velocidade média do percurso (VAP) no grupo baixa carnosina em relação ao grupo média – baixa (Figura 22).

Figura 22 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na velocidade de trajeto (VAP) pós descongelação – São Paulo – 2017

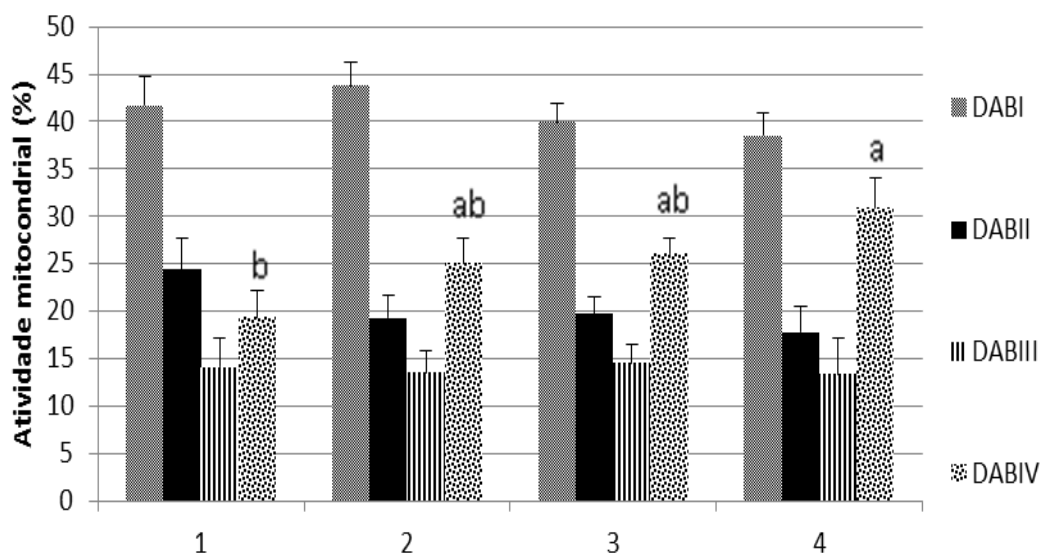


a, b: sobrescritos indicam diferenças entre as concentrações ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Ademais, o grupo de amostras que possuem baixas concentrações de carnosina maior porcentagem de células com ausência de atividade mitocondrial (DAB IV) e comparação ao grupo alta carnosina (Figura 23).

Figura 23 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) nas atividades mitocondrial alta (DABI), média (DABII), baixa (DABIII) e nula (DABIV) pós descongelação – São Paulo – 2017

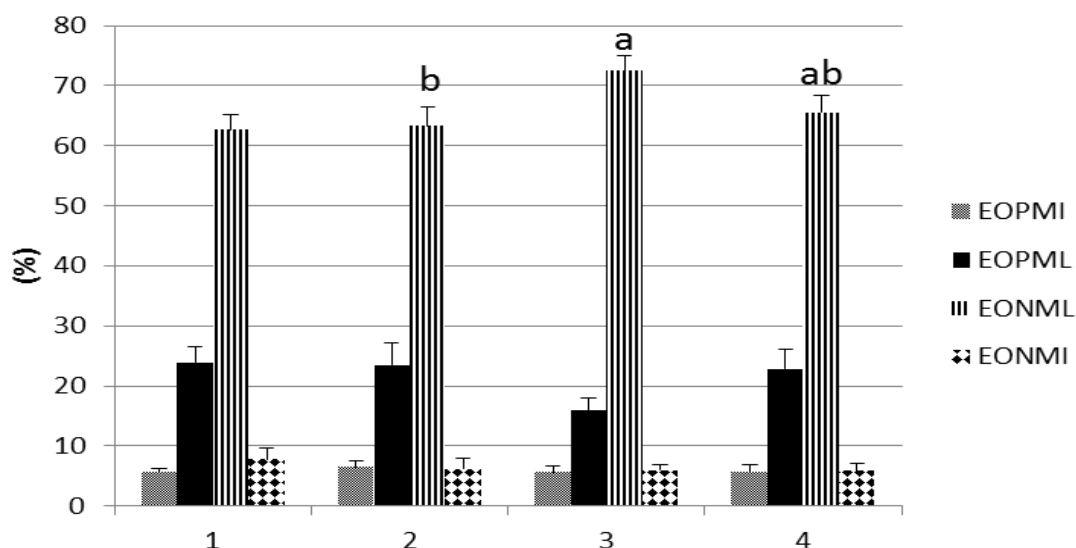


a, b, c: sobrescritos indicam diferenças entre as concentrações ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Por fim, verificamos maior população de células com baixa produção de EROs e membrana lesada (EONML) (Figura 24) e baixo potencial de membrana mitocondrial (JCB) em amostras seminais com concentrações de carnosina média – baixa (Figura 25).

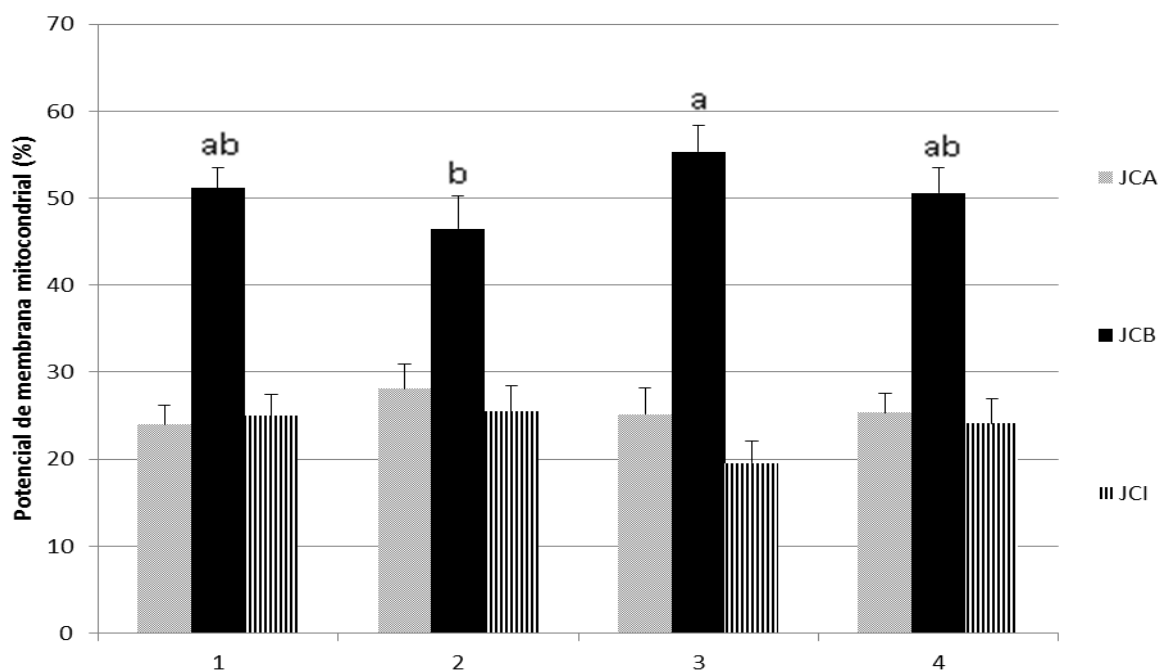
Figura 24 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) na detecção de espécies reativas de oxigênio e na integridade de membrana plasmática (EOPMI: espécies reativas de oxigênio positiva e integridade de membrana; EOPML: espécies reativas de oxigênio positiva e alteração de membrana; EONML: espécies reativas de oxigênio negativa e alteração de membrana; EONMI: espécies reativas de oxigênio negativa e integridade de membrana) pós descongelação – São Paulo – 2017



a, b: sobrescritos indicam diferenças entre as concentrações ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

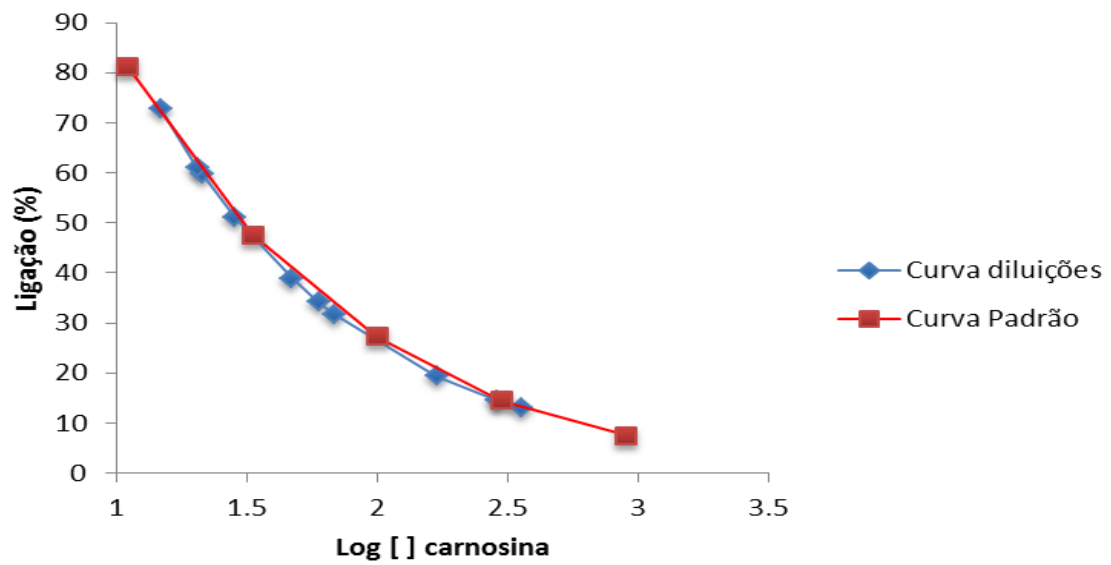
Figura 25 - Efeito das concentrações de carnosina alta (1); média alta (2); média baixa (3); baixa (4) nos potenciais de membrana mitocondrial alto (JCA), intermediário (JCI), baixo (JCB) pós descongelação – São Paulo – 2017



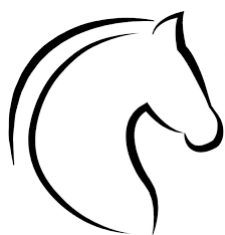
a, b: sobrescritos indicam diferenças entre as concentrações ($p < 0,05$).

Fonte: (ROCHA, C. C., 2017)

Figura 26 – Teste de paralelismo para a validação do kit de ELISA de carnosina no plasma seminal de equinos.



Fonte: (PEREIRA, R. J. G., 2017)



DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A refrigeração e a criopreservação espermática são biotécnicas chave na reprodução assistida equina. No entanto, tais procedimentos causam redução na viabilidade espermática (AMANN; PICKETT, 1987). Dentre as principais causas desta redução, destacam-se a desidratação celular excessiva, a formação de cristais de gelo, o desequilíbrio osmótico e alterações na permeabilidade das membranas (WATSON, 1995). No entanto, o desequilíbrio oxidativo espermático causado pela produção exacerbada das espécies reativas de oxigênio (EROs) ou redução da capacidade antioxidante local parece estar relacionado, direta ou indiretamente, a várias destas alterações (BOLDYREV, 2005). Além do efeito deletério das EROs, os produtos da peroxidação lipídica, podem ser extremamente deletérios ao espermatozoide, e o malondialdeído (MDA) destaca-se (TAVILANI et al., 2005). De fato, estudos demonstram que o malondialdeído pode ser extremamente citotóxico aos espermatozoides, ocasionando redução da motilidade, aumento nos danos de DNA e diminuição da ligação espermatozoide-oócito, ocasionando infertilidade (KO; SABANEKH; AGARWAL, 2014; AITKEN et al., 2015).

Destarte a ação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos no equilíbrio oxidativo seminal, estes não são capazes de debelar o malondialdeído. No entanto, sabe-se que algumas proteínas, como a carnosina, são capazes de combater o MDA, evitando a progressão dos danos oxidativos lipídicos (HOLT, 2000). De fato, a carnosina foi identificada no sêmen de equinos por Ducci e colaboradores (2005). Todavia, estudos relacionados a esta área são escassos na literatura científica e, tampouco se conhece sobre o efeito desta proteína na fisiologia dos espermatozoides equinos. Portanto, o presente estudo foi conduzido objetivando relacionar as concentrações de carnosina do plasma seminal à funcionalidade e status oxidativo dos espermatozoides equinos com alta e baixa tolerância aos processos de refrigeração e criopreservação.

No processo de refrigeração espermática, as amostras seminais foram divididas em grupos de alta e baixa resistência à refrigeração de acordo com as

motilidades totais superiores ou inferiores a 50%, respectivamente. Observamos no grupo de amostras com alta tolerância à refrigeração uma maior atividade mitocondrial. De fato, estudos demonstram que a fosforilação oxidativa na espécie equina é a principal fonte de energia para o espermatozoide equino (KANKOFER et al., 2005), oposto do observado em algumas espécies, como os murinos (JEYENDRON et al., 1984), em que a glicólise para ser a principal via de obtenção de ATP. Neste mesmo grupo observamos maior produção de espécies reativas de oxigênio e maior susceptibilidade à peroxidação lipídica. Corroborando com tais resultados, estudos relataram maiores taxas de oxidação fisiológica em células metabolicamente mais ativas (FRACZEK et al., 2001).

Contudo, vale ressaltar que as espécies reativas de oxigênio quando em equilíbrio com a capacidade antioxidante possuem efeito fisiológico nos processos de fecundação, tais como a hiperativação espermática, reação acrossomal, ligação entre espermatozoide-oócito e penetração espermática através da zona pelúcida (SHARMA e AGARWALL, 1996). Assim, hipotetizamos que as taxas de oxidação observadas no grupo de alta tolerância a refrigeração são fisiológicas, uma vez que este grupo possuía maior porcentagem de células com membrana plasmática e acrossomo intactos em relação ao grupo de amostras seminais com baixa tolerância à refrigeração. Ademais, o grupo com maior resistência à refrigeração apresentou maiores concentrações de carnosina, que possivelmente atuou debelando o excesso de espécies reativas de oxigênio e malondialdeído, estabelecendo uma homeostase oxidativa.

Não obstante aos resultados de refrigeração, as amostras seminais foram divididas quanto às suas concentrações de carnosina: 1 (alta), 2 (média – alta), 3 (média – baixa) e 4 (baixa). Assim, verificamos que o grupo de amostras espermáticas com maiores concentrações de carnosina apresentou menores concentrações de MDA, comprovando a eficiência desta proteína em combater produtos da peroxidação lipídica em equinos. Ainda, observamos menor porcentagem de células com lesões nas membranas plasmática e acrossomal, provavelmente devido à prevenção da produção exacerbada de EROS e produtos da peroxidação lipídica.

Apesar do efeito protetor da carnosina nas estruturas espermáticas e no equilíbrio oxidativo, verificamos menor motilidade no grupo alta carnosina em comparação ao grupo de baixa carnosina. Neste contexto, as principais vias de obtenção de energia para o espermatozoide são a via glicolítica e a fosforilação oxidativa (SEIDLER, 2002). A fosforilação oxidativa parece ser a principal via de obtenção de energia para a motilidade dos espermatozoides equinos (PEÑA, 2016). No entanto, alguns estudos têm demonstrado que a via glicolítica parece ser tão importante quanto a fosforilação oxidativa para a espécie (FRACZEK et al., 2001). Além disso, o ATP produzido pelas mitocôndrias na peça intermediária parece não se difundir de forma eficiente até as porções mais distais do flagelo (VIDAMENT, 2005). Portanto, a via glicolítica atua de forma complementar para a fosforilação oxidativa para o batimento flagelar. Ademais, o produto final da glicólise, o piruvato, é essencial para o funcionamento mitocondrial (HOLT, 2000). Então, a carnosina pode atuar como sequestradora de compostos intermediários da glicólise e consequentemente reduzir os níveis de piruvato, podendo alterar a produção energética tanto pela glicólise quanto pela mitocôndria. Desta forma, apesar dos níveis de ATP não serem mensurados, a redução na motilidade do grupo de amostras com altas concentrações de carnosina nos sugere que, grandes quantidades desta proteína, podem ter ocasionado alterações do metabolismo energético dos espermatozoides e consequente redução da motilidade. Adicionalmente, estes resultados nos sugerem que concentrações intermediárias de carnosina possam promover o equilíbrio oxidativo sem causar alterações metabólicas.

Em relação ao processo de criopreservação espermática, as amostras seminais foram divididas em grupos de alta e baixa tolerância à este procedimento, de acordo com as motilidades totais superiores ou inferiores a 30%, respectivamente. Assim, observamos no grupo de baixa tolerância à criopreservação menor atividade e potencial de membrana mitocondrial. Tal fato já havia sido observado em amostras seminais de equinos de baixa congelabilidade que apresentaram disfunções mitocondriais (WATSON, 2000). Ademais, pesquisas tem relatado que disfunções nesta organela possuem correlação positiva com estresse oxidativo e negativa com integridade de DNA e desenvolvimento embrionário, parecendo formar um mecanismo patogênico

único (LOVE et al., 2002). Corroborando com estes trabalhos, além das alterações mitocondriais, observamos maior produção de espécies reativas de oxigênio. Destarte o incremento fisiológico da produção de EROs no grupo de amostras com alta resistência a refrigeração seminal, acreditamos que esta maior produção no grupo de baixa criotolerância não seja fisiológica uma vez que foi acompanhado por uma maior porcentagem de células com membrana lesada e com maior susceptibilidade da cromatina à denaturação ácida.

Ainda, não foram observadas diferenças nas concentrações de carnosina entre os grupos de alta e baixa congelabilidade. Aparentemente, a carnosina não foi capaz de prevenir danos oxidativos dos espermatozoides com baixa tolerância à criopreservação. O fato desta proteína estar em maior quantidade em amostras seminais de alta tolerância à refrigeração nos sugere que a carnosina confere efeito protetor contra danos oxidativos ao espermatozoide equino. No entanto, acreditamos que este efeito não foi observado na congelabilidade, pois esta proteína está presente no plasma seminal, que é removido para realizarmos o processo de criopreservação. Desta forma, terapias utilizando carnosina durante a criopreservação parece ser uma opção interessante na prevenção de danos oxidativos. Portanto, a avaliação do efeito de diferentes concentrações de carnosina na funcionalidade e homeostase oxidativa dos espermatozoides equinos durante os processos de refrigeração e criopreservação pode ser elucidativa na escolha da concentração ideal da carnosina para futuras terapias espermáticas.

8. CONCLUSÃO

Considerando-se os resultados desta pesquisa, conclui-se que a carnosina possui um efeito protetor durante a refrigeração seminal, podendo ser um dos motivos para a maior resistência de alguns animais durante este processo. No entanto, com a retirada do plasma seminal durante o processo de criopreservação, a carnosina do plasma seminal não parecer estar relacionada à qualidade pós-descongelamento.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SALEH, R. A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. ***Urologic Clinics of North America***, v. 29, p.1-12, 2002.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S. A.; SAID, T. M. Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. ***Journal of Andrology***, v. 26, n. 6, 2005.

AGARWAL, A.; MAKKER K, SHARMA R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. ***American Journal of Reproduction Immunology***, v.59, p. 2-11, 2008.

ALDINI, G.; FACINO, R. F.; BERETTA, G.; CARINI, M. Carnosine and related dipeptides as quenchers of reactive carbonyl species: from structural studies to therapeutic perspectives. ***Biofactors***, v. 24, p.77–87, 2005.

ALVARENGA, M. A.; M. T. CARMO. Biotecnologia em reprodução equina: O que há de novo para o veterinário de campo. *Jornal Brasileiro de Medicina Equina*, p.26-30, 2007.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. ***Journal of Andrology***, v. 13, p. 232-241, 1992.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; JUNIOR, B. J. The effect of breed and spermatoc parameters over equine semen freezability. In: SYMPOSIUM OF STALLION SEMEN, 1996, Amersfort, ***Proceedings***, p. 82, 1996.

ALVARENGA, M. A. **Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões** [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2002.

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).

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

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C.; ANDRADE, A.; GARCIA, A.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.; SOUZA, L. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. ***Acta Scientiae Veterinariae***, v. 33, n. 01, p. 145-150, 2005.

AURICH, J. E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology** v. 46. p. 791-797, 1996.

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

BALL, B. A.; VO, A. T.; Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 1061-1069, 2001.

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

BALLS, M. et al. Report and recommendations of the CAAT/ERGATT workshop on validation of toxicity test procedures. **ATLA**, v. 18, p. 313–37, 1990.

BARCELÓ, D.; NUNES, S. G.; TOSCANO, I. A. Immunoassays for pesticide analysis in environmental and food matrices. **Food Technology Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 245-255, 1998.

BOLDYREV, A; BULYGINA, E.; LEINSOO, T.; PETRUSHANKO, I.; TSUBONE, S.; ABE, H. Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 137, p.81–88, 2004.

BOLDYREV, A. A. Protection of proteins from oxidative stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1057, p.1–13, 2005.

BOLDYREV, A. A.; GIANCARLO, A.; DERAIVE, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. **Physiology Reviews**, v. 93, p. 1803-1845, 2013.

BOYLE, M. S. Assessing the potential fertility of frozen stallion semen. In: Allen WR and Wade JF (eds.), Havemeyer Foundation Monography series. R & W Publication LTD, **Newmarket**, n. 1, p. 13-16, 1999.

BURCHAM, P. C.; KAMINSKAS, L. M.; FONTAINE, F. R.; PETERSEN, D. R.; PYKE, S. M. Aldehyde-sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products. **Toxicology**, v. 181–182, p. 229-236, 2002.

BLANCHARD, T. L. et al. **Manual of equine reproduction**. New York: Mosby, p. 117, 2003.

BRINSKO S.P., VARNER D.D. Artificial insemination and preservation of semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, p. 205-218, 1992.

BRINSKO, S.P., CROCKETT, E.C., SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p.129–36, 2000.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.

CAMPISI, J. Senescent cells, tumor suppression and organismal aging: good citizens, bad neighbors. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 513-522, 2005

COSTA, M.D.; BERGMANN, J.A.G.; REZENDE, A.S.C. et al. Caracterização demográfica da raça Mangalarga Marchador. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.687-690, 2004.

CHENIER, T.S.; ESTRADA, A.T.; KOENIG, J.B. Theriogenology Question of the Month. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 230, n. 10, p. 1469-1472, 2007.

DECKER, E. A.; LIVISAY, S. A.; ZHOU, S. A re-evaluation of the antioxidant activity of purified carnosine, **Biochemistry**, v.65, p.766-770, 2000.

DOWSETT, K. F.; OSBORNE, H. G.; PATTIE, W. A. Morphological characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 22, n. 5, p. 463-472, 1984.

DUCCI, M.; GAZZANO, A.; PACCHINI, S.; NICCOLINI, A.; VITALE, A.; MARTELLI, F.; GADEA, J. Quantitative determination of imidazole dipeptides in stallion spermatozoa and seminal plasma. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 379, 2005.

DUNNETT, M.; HARRIS, R.C. High-performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in equine and camel muscle and individual muscle fibres. **Journal Chromatography Biomedical Sciences Applications**, v. 688, p. 47–55, 1997.

DURU, N.K.; MORSHEDI, M. AND OEHNINGER, S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 74, p.1200-207, 2000.

ESTEVEZ, P. A. **Análise da região carboxi-terminal da Glicoproteína C (gC) e sua utilização na diferenciação entre herpesvírus bovinos tipos 1 (BoHV-1) e 5 (BoHV-5)**. 2007. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FARRÁS M.C.; FIORATTI, E. G.; NETO, C. R.; CARMO M. T.; OLIVEIRA. A. R.; PAPA, O. F.; FILHO, J. N. P. P.; ALVARENGA, M. A. Comparação de

diferentes temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador e Quarto de Milha. **Veterinária e Zootecnia**, v. 21, n. 1, p. 187-195, 2014.

FARREL, P. B.; PRESICCE, G. A.; BROCKETT, C. C.; FOOTE, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, p. 871-979, 1998.

FRACZEK, M.; SZKUTNIK, D.; SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Peroxidation components of sperm lipid membranes in male infertility. **Ginekologia Polska.**, v. 72, p. 73-79, 2001.

FREITAS, B.W. 2010. **Parâmetros fisiológicos e seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador na região da zona da mata mineira no decorrer das estações climáticas**. Tese de mestrado. Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa.

GAMBOA, S. C. O. P. **Infertilidade equina: múltiplas fragilidades ou um “fado do espermatozoide”**. 2011. 267 f. Dissertação (Doutorado em Biologia) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, 2011.

GARIBALLA, S. E.; SINCLAIR, A. J. Review. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. **Age Ageing**, v. 29, p. 207-210, 2000.

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

GOMES, G.M.; GOMES, L.P.M. Problemas e soluções com o uso de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.6, p.210-215, dez. 2009.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.E.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, p. 187-195, 2004

GUERRA, M. M. P.; SOARES, A. T. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 2, p. 53-63, 2009.

HEAPE, W. The artificial insemination of mammals and subsequent possible fertilization or impregnation of their ova. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 61, p. 52-63, 1987.

HIPKISS, A.R.; MICHAELIS, J.; SYRRIS, P. Non-enzymic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. **FEBS Letts**, v. 371, p. 81–85, 1995.

HIPKISS, A. R. On the enigma of carnosine's anti-ageing actions. **Experimental Gerontology**, v. 44, n.4, p.237–242, 2009.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

HOFFMANN, A.M.; BAKARDJIEV, A.; BAUER, K. Carnosine-synthesis in cultures of rat glial cells is restricted to oligodendrocytes and carnosine uptake to astrocytes. **Neuroscience Letters**, v. 215, p. 29–32, 1996.

JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion. **Theriogenology**, v. 35, p. 317-327, 1990.

JASKO, F. JJ; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. **Proc 38th Ann Conv AAEP**, p. 649-660, 1992.

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

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEM, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRAVO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

JOHNSON, L.; THOMPSON JR. D.L. Effect of seasonal changes in leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p. 227–232, 1987.

KANAYAMA, C. Y.; BELETTI, M. E. Avaliação computacional da compactação da cromatina e de características morfológicas da cabeça de espermatozoides de coelho (*oryctolagus cuniculus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 1, p. 94-99, 2011.

KANG, J. H. Protective effects of carnosine and relative compound on DNA cleavage by advanced glycation end products. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 26, n. 1, p. 178-180, 2005.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, v,63, p.1354-65, 2005.

KATILA, T.; ANDERSON, M.; REILAS, T.; KOSKINEN, E. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 58, p. 241-244, 2001.

KOHEN, R.; YAMAMOTO, Y.; CUNDY, K. C.; AMES, B. N. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 3175-3170, 1988.

KROGENS, A.; ANDERSEN-BERG, K.; HAFNE, A. L.; ENGELAND, E. Membrane alterations in bull spermatozoa after freezing and thawing and after in vitro fertilization. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 35, p. 17-26, 1994.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. (Ed). **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: CEPEA/ESALQ/USP, 2006. 251p.

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

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

LOVE, C. C.; THOMPSON, J.A.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1135-1142, 2002.

LOVE, C. C. The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 39-45, 2005.

McDONNELL, S. M. Techniques for Extending the Breeding Career of Aging and Disabled Stallions. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 4, n. 3, p. 269-276, 2005.

McFARLAND, G. A.; HOLLIDAY, R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. **Experimental Cell Research**, v. 212, p. 167-175, 1994.

McFARLAND, G. A.; HOLLIDAY, R. Further evidence for the rejuvenating effects of dipeptide l-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. **Experimental Gerontology**, v. 34, p. 35-45, 1999.

McKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. **Australian Equine Veterinarian**, v. 14, n. 4, p.156-175, 1996.

METZ, B.; HENDRIKSEN, C. F.; JIKOOT, W.; KERSTEN, G. F. Reduction of animal use in human vaccine quality control:opportunities and problems. **Vaccine**, v. 20, n. 19-20, p. 2411-30, jun. 2002.

MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. **Theriogenology**, v.70, p.463-468, 2008.

MORRIS, L. H.; TIPLADY, C.; ALLEN. W. R. Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopyc insemination of low numbers of frozen-thawed

spermatozoa onto the uterotubal junction. **Equine Veterinary Journal**, n. 35, v. 2, p. 197-201, 2003.

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2372-2381, 2005.

MORRELL, J. M., WALLGREN, M. Colloid centrifugation of boar semen. **Reproduction Domestic Animals**, v. 46, p.18–22, 2011.

NEVEZ, M. G. **Perfil de testosterona e parâmetros seminais de garanhões da raça Mangalarga Marchador dentro e fora da estação reprodutiva**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 2014. 48f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.

NICHI, M. **Sistemas de produção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003. 103 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo USP, São Paulo, 2003.

OXENHAM, S. K.; TARDIF, S.; BEATON, C.; MANSELL, S.; BARRATT, L. R. C. Diagnostic tools in male infertility – the question of sperm dysfunction. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 53-58, 2011.

PAVLOV, A. R.; REVINA, A. A.; DUPIN, A. M.; BOLDYREV, A. A.; IAROPOLOV, A. I. Interactions of carnosine and superoxide radicals in aqueous solutions. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 110, p. 391-393, 1990.

DAVILA, M. P.; MUÑOZ, M.; BOLAÑOS J. M. G.; STOUT, A E; B M GADELLA B. M.J, TAPIA, A.; SILVA, C. B., FERRUSOLA, C. O.; PEÑA, F. A. Mitochondrial ATP is required for the maintenance of membrane integrity in stallion spermatozoa, whereas motility requires both glycolysis and oxidative phosphorylation. **Biology Reproduction**, p.682-694, 2016.

REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v. 30, n.18, p. 4480-4486, 1991.

ROZEBOOM, K. J.; TROEDSSON, M. H. T.; HODSON, H. H. The importance of seminal plasma on spermatozoa viability of subsequent artificial inseminations in swine. **Journal of Animal Science**, v.78, p.443-448, 2000.

SAMPER, J.C. Artificial insemination. In: SAMPER, J.C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: WB Saunders Company, p.109–131, 2000.

SEIDLER, N. W.; YEARGANS, G. S. Effects of thermal denaturation on protein glycation. **Life Science**, v. 70, n. 15, p. 1789-1799, 2002.

SIEME, H.; HARRISON, R. A. P.; PETRUNKINA, A. M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 276-292, 2008.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility (review). **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

SMITH, M. F.; MORRIS, D. L.; AMOSS, M. S.; PARISH, N. R.; WILLIAMS, J. D.; WILTBANK, J. N. Relationship among fertility, scrotal circumference, seminal quality and libido in Santa Gertrudis bulls. **Theriogenology**, v. 16, p. 379, 1981.

TAVILANI H, DOOSTI M, SAEIDI H. Malondialdehyde levels in sperm and seminal plasma of asthenozoospermic and its relationship with semen parameters. **Clinica Chimica Acta**.v. 356, n.1-2, p.199-203, 2005.

TIZARD, I. **Introdução á Imunologia veterinária**. 2ed., Roca, São Paulo, p. 545, 1998.

THOMASSEN, R. Insemination with stallion semen frozen in 0,5 ml straws. **Reproduction Domestic Animals**, v. 28, p. 289-293, 1993.

TROEDSSON, M.H.T.; ALGHAMDI, A.S.; MATTISEN, Journal Equine. Seminal plasma protects the fertility of spermatozoa in an inflamed uterine environment. **Theriogenology**, v.58, p.453-456, 2002.

SAS. **Statistical Analysis System**. SAS Institute, 8.0 versão para Windows®, 2000.

SHANG XJ, LI K, YE ZQ, CHEN YG, YU X, HUANG YF. Analysis of lipid peroxidative levels in seminal plasma of infertile men by high-performance liquid chromatography. **Archives of Andrology**, v. 50, n.6, p.411-6, 2004,

SHAO, L.; LI, Q.H.; TAN, Z. L-carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 324, p. 931–936, 2004.

UH, H.; HARTGERS, F.; YAZDANBAKHSH, M.; HOUWING-DUISTERMAAT, J. J. Evaluation of regression methods when immunological measurements are constrained by detection limits. **BCM Immunologycal**, England, v. 9, p.1-10, 2008.

VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; BLISS, S. B.; CARROLL, B. S.; ESLICK, M. C. Semen processing for the subfertile stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, 2008.

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

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm membranes. In: Clarke A, Morris GJ (Ed.). Effects of low temperatures on biological membranes. London: **Academic Press**, 1981. p.189-218.

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

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

WANG, A. M.; MA, C.; XIE, Z. H.; SHEN, F. Use of carnosine as a natural anti-senescence drug for human beings. **Biochemistry**, v. 65, n. 7, p. 869-871, 2000.

WEINERT, B.; TIMIRAS, P. Invited review: theories of aging. **Journal Applied Physiology**, v. 95, p.1706-1716, 2003.

WOELDERS, H. Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 1, p. 145-164, 1991.

YEARGANS, G. S.; SEIDLER, N. W. Carnosine promotes the heat denaturation of glycosylated protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 300, n. 1, p. 75-80, 2003.

ANEXOS

ANEXO A - Médias de quadrados mínimos com respectivos erros padrão das variáveis analisadas da refrigeração após 24 horas dos grupos de boa (BR) e má (MR) refrigeração.

VARIÁVEIS	MR	BR	P
VAP ($\mu\text{m/s}$)	70.20 \pm 5.13	95.63 \pm 3.59	0.0002
VSL ($\mu\text{m/s}$)	41.86 \pm 2.89	68.86 \pm 2.62	<0.0001
VCL ($\mu\text{m/s}$)	145.90 \pm 10.14	184.30 \pm 6.55	0.0022
ALH (μm)	5.64 \pm 0.42	6.66 \pm 0.21	0.296
BCF (Hz)	38.85 \pm 1.94	42.31 \pm 0.55	0.5474
STR (%)	59.05 \pm 3.39	73.78 \pm 1.67	0.0001
LIN (%)	30.36 \pm 2.11	40.34 \pm 1.31	<0.0001
MOTILE (%)	27.82 \pm 2.41	65.93 \pm 1.79	<0.0001
PROGRESSIVE (%)	7.03 \pm 1.06	32.37 \pm 2.39	<0.0001
RAPID (%)	16.54 \pm 2.03	50.24 \pm 2.22	<0.0001
MEDIUM (%)	11.31 \pm 1.44	15.71 \pm 1.66	0.0769
SLOW (%)	38.15 \pm 3.36	24.98 \pm 1.71	0.0008
STATIC (%)	33.95 \pm 5.03	9.02 \pm 1.55	<0.0001
EOSINA (%)	49.55 \pm 2.53	59.40 \pm 1.84	0.0022
POPE (%)	56.60 \pm 2.91	62.22 \pm 2.70	0.1611
DABI (%)	36.03 \pm 3.12	46.83 \pm 4.07	0.0417
DABII (%)	36.57 \pm 2.07	35.41 \pm 2.11	0.6987
DABIII (%)	21.16 \pm 2.08	17.73 \pm 2.38	0.0175
DABIV (%)	9.03 \pm 1.39	7.51 \pm 1.26	0.1829
SCSA (%)	4.08 \pm 0.70	2.68 \pm 0.35	0.1312
TBARS ($\text{ng}/10^6$)	44.91 \pm 22.13	38.00 \pm 13.38	0.9871
TBARSPS (ng/mL)	131.92 \pm 12.25	193.23 \pm 18.22	0.0064
EOPMI (%)	18.33 \pm 1.84	26.40 \pm 1.49	0.001
EOPML (%)	6.17 \pm 0.85	6.71 \pm 1.25	0.8565
EONML (%)	67.13 \pm 1.96	58.84 \pm 2.14	0.0045
EONMI (%)	8.38 \pm 1.15	8.06 \pm 0.95	0.75
JCA (%)	28.62 \pm 1.90	32.78 \pm 1.72	0.1077
JCB (%)	55.79 \pm 1.78	51.49 \pm 1.94	0.1071
JCI (%)	15.60 \pm 1.22	15.91 \pm 1.21	0.5902
ALMI (%)	6.73 \pm 0.69	5.95 \pm 0.46	0.5002
ALML (%)	50.77 \pm 2.67	38.73 \pm 1.99	0.0005
AIML (%)	17.52 \pm 1.60	20.25 \pm 1.59	0.1535
AIMI (%)	23.88 \pm 2.01	35.06 \pm 1.94	0.0002
CAR (ng/mL)	159.72 \pm 15.99	224.98 \pm 19.16	0.0056

ANEXO B - Médias de quadrados mínimos com respectivos erros padrão das variáveis analisadas da pós descongelação dos grupos de boa (BC) e má (MC) congelação.

VARIÁVEIS	MC	BC	P
VAP ($\mu\text{m/s}$)	50.12 \pm 2.44	62.43 \pm 1.54	<0.0001
VSL ($\mu\text{m/s}$)	36.84 \pm 1.97	45.47 \pm 1.43	0.0003
VCL ($\mu\text{m/s}$)	105.15 \pm 4.75	129.28 \pm 2.64	<0.0001
ALH (μm)	6.41 \pm 0.30	6.59 \pm 0.10	0.68
BCF (Hz)	36.44 \pm 1.43	38.40 \pm 0.51	0.55
STR (%)	65.80 \pm 2.64	69.16 \pm 1.02	0.29
LIN (%)	33.98 \pm 1.51	35.32 \pm 0.80	0.72
MOTILE (%)	16.37 \pm 1.29	50.66 \pm 2.35	<0.0001
PROGRESSIVE (%)	5.10 \pm 0.66	19.37 \pm 1.51	<0.0001
RAPID (%)	7.07 \pm 0.82	29.34 \pm 2.04	<0.0001
MEDIUM (%)	9.32 \pm 0.72	21.34 \pm 1.04	<0.0001
SLOW (%)	30.20 \pm 2.94	27.95 \pm 1.92	0.59
STATIC (%)	53.29 \pm 3.44	21.39 \pm 1.87	<0.0001
EOSINA (%)	45.27 \pm 2.29	56.24 \pm 2.05	0.0007
POPE (%)	86.00 \pm 1.88	90.18 \pm 1.33	0.09
DABI (%)	37.08 \pm 2.15	45.05 \pm 2.01	0.01
DABII (%)	21.58 \pm 1.71	18.66 \pm 1.80	0.13
DABIII (%)	15.98 \pm 1.47	11.74 \pm 0.96	0.07
DABIV (%)	25.38 \pm 2.62	25.53 \pm 1.70	0.59
SCSA (%)	1.94 \pm 0.32	1.02 \pm 0.11	0.004
TBARS (ng/10⁶)	15.36 \pm 2.24	12.04 \pm 3.28	0.06
TBARSPS (ng/mL)	132.36 \pm 11.48	197.57 \pm 19.76	0.004
EOPMI (%)	5.77 \pm 0.64	6.04 \pm 0.83	0.83
EOPML (%)	19.31 \pm 2.34	26.24 \pm 2.27	0.02
EONML (%)	68.39 \pm 1.83	63.07 \pm 2.24	0.07
EONMI (%)	8.05 \pm 1.03	4.64 \pm 1.08	0.39
JCA (%)	23.14 \pm 2.10	30.04 \pm 1.85	0.01
JCB (%)	55.72 \pm 2.15	44.11 \pm 1.97	0.0002
JCI (%)	21.16 \pm 1.63	25.86 \pm 2.23	0.21
ALMI (%)	8.65 \pm 2.62	3.73 \pm 0.37	0.01
ALML (%)	47.94 \pm 1.29	44.31 \pm 1.46	0.06
AIML (%)	37.81 \pm 1.46	41.13 \pm 1.31	0.10
AIMI (%)	15.40 \pm 7.40	10.83 \pm 1.21	0.22
CAR (ng/mL)	188.32 \pm 17.08	193.74 \pm 20.16	0.92

ANEXO C - Média dos grupos das concentrações de carnosina 1 (alto), 2 (média alta), 3 (média baixa), 4 (baixa) nos espermatozoide de garanhões refrigerados

VARIAVÉIS	1	2	3	4
VAP (µm/s)	84.00±6.47	81.59±6.41	84.58±6.45	82.77±8.23
VSL (µm/s)	51.09±4.04	58.74±4.68	56.52±4.98	56.44±5.99
VCL (µm/s)	168.93±12.59	158.25±11.41	170.03±11.60	165.12±15.35
ALH (µm)	6.06±0.39	5.93±0.44	6.52±0.56	6.15±0.53
BCF (Hz)	43.54±0.90	41.44±1.01	41.77±0.87	42.13±0.75
STR (%)	61.80±4.61 ^b	74.65±2.57 ^a	67.10±2.62 ^{ab}	62.85±5.32 ^b
LIN (%)	32.35±2.75 ^b	40.65±2.06 ^a	35.90±2.37 ^{ab}	33.00±3.20 ^b
MOTILE (%)	39.00±4.98 ^b	49.40±5.71 ^{ab}	46.90±4.22 ^{ab}	54.10±5.59 ^a
PROGRESSIVE (%)	16.55±4.38	22.10±4.29	17.65±3.34	23.75±3.50
RAPID (%)	29.40±4.64	33.05±5.13	31.85±4.56	40.95±4.95
MEDIUM (%)	9.60±1.59 ^b	16.40±2.81 ^a	15.30±1.96 ^{ab}	12.95±2.33 ^{ab}
SLOW (%)	33.25±4.49 ^{ab}	26.10±3.20 ^b	39.45±3.83 ^a	26.80±3.80 ^b
STATIC (%)	27.80±6.02	24.25±6.55	13.55±3.63	19.10±6.58
EOSINA (%)	52.90±3.08	57.60±2.88	54.20±2.97	53.70±4.19
POPE (%)	54.88±4.34	63.65±3.31	56.63±3.99	62.78±4.19
DABI (%)	42.30±4.36	44.95±5.95	43.00±6.76	36.80±4.22
DABII (%)	30.00±2.24 ^b	34.58±3.12 ^b	44.47±3.06 ^a	35.15±2.55 ^b
DABIII (%)	19.25±3.13	16.26±2.84	20.42±3.57	21.40±3.29
DABIV (%)	8.50±1.89	9.53±2.29	8.05±1.87	6.90±1.46
SCSA (%)	2.97±0.50	2.89±0.55	3.53±0.60	4.06±1.25
TBARS (ng/10⁶)	60.14±42.74	47.53±26.27	28.61±8.02	28.73±5.96
TBARSPS (ng/mL)	79.33±6.72 ^c	140.45±11.70 ^b	202.57±16.30 ^a	231.02±32.35 ^a
EOPMI (%)	24.85±3.10	21.45±2.21	20.97±2.10	22.89±2.53
EOPML (%)	7.12±1.31	6.47±1.45	5.46±1.24	6.77±2.07
EONML (%)	60.48±3.55	65.12±2.18	66.22±2.58	59.50±3.43
EONMI (%)	7.56±1.44 ^{ab}	6.96±1.52 ^b	7.36±1.13 ^{ab}	10.83±1.68 ^a
JCA (%)	31.42±2.55	32.10±2.16	28.03±2.84	31.22±2.86
JCB (%)	52.42±2.78	53.21±2.12	56.74±2.91	52.23±2.88
JCI (%)	16.54±2.18	14.68±1.45	15.24±1.81	16.55±1.33
ALMI (%)	5.60±0.46 ^b	5.20±0.53 ^b	5.99±0.67 ^b	8.60±1.23 ^a
ALML (%)	39.13±4.00 ^b	46.16±2.98 ^{ab}	50.68±3.46 ^a	41.95±3.51 ^{ab}
AIML (%)	21.96±2.25 ^a	19.18±2.16 ^{ab}	15.48±1.74 ^b	19.24±2.75 ^{ab}
AIMI (%)	31.09±3.86	29.46±2.52	27.84±3.15	30.20±2.85

a, b, c: Diferentes sobrescritos na mesma linha indicam diferenças estatísticas (p<0.05).

ANEXO D - Média dos grupos das concentrações de carnosina 1 (alto), 2 (média alta), 3 (média baixa), 4 (baixa) nos espermatozoide de garanhões congelados

VARIÁVEIS	1	2	3	4
VAP (µm/s)	54.60±2.49 ^{ab}	59.86±2.19 ^{ab}	53.86±2.59 ^b	60.97±2.75 ^a
VSL (µm/s)	39.59±2.04	44.09±2.03	37.87±2.99	41.91±3.19
VCL (µm/s)	114.94±3.99	124.36±3.56	113.50±4.86	125.71±5.18
ALH (µm)	6.71±0.17	6.84±0.22	6.29±0.45	6.19±0.36
BCF (Hz)	37.74±0.85	37.88±0.74	38.62±0.80	39.12±0.74
STR (%)	69.20±1.28	69.15±1.68	69.63±1.95	68.63±1.50
LIN (%)	35.30±1.21	35.65±1.28	35.42±1.29	35.42±1.18
MOTILE (%)	34.35±4.63	33.00±4.53	29.40±4.83	34.10±4.79
PROGRESSIVE (%)	11.85±2.36	12.50±1.97	10.35±2.39	12.75±2.39
RAPID (%)	17.90±3.37	18.50±3.15	14.80±3.27	19.40±3.42
MEDIUM (%)	16.35±1.73	14.60±1.80	14.70±2.11	14.70±1.73
SLOW (%)	27.35±2.91	28.05±3.31	28.60±4.08	31.85±3.86
STATIC (%)	38.25±4.66	38.80±5.07	42.00±6.04	33.95±5.73
EOSINA (%)	51.15±2.34	52.55±3.20	45.85±3.27	52.40±4.07
POPE (%)	86.55±2.72	88.95±2.59	88.15±2.09	87.65±2.15
DABI (%)	41.70±3.05	43.80±3.31	39.95±3.02	38.53±2.80
DABII (%)	24.35±2.44	19.30±2.38	19.70±2.35	17.79±2.70
DABIII (%)	14.10±1.98	13.45±1.77	14.55±1.89	13.32±1.65
DABIV (%)	19.35±2.40 ^b	25.05±2.63 ^{ab}	26.00±3.87 ^{ab}	30.95±3.02 ^a
SCSA (%)	1.20±0.16	1.38±0.25	1.52±0.27	1.35±0.19
TBARS (ng/10⁶)	16.44±5.40	12.23±3.13	11.07±2.30	13.33±3.59
TBARSPS (ng/mL)	151.66±23.68	164.95±21.09	137.40±15.53	199.35±29.29
EOPMI (%)	5.67±0.66	6.49±1.09	5.59±1.15	5.71±1.24
EOPML (%)	23.92±2.62	23.51±3.65	15.97±2.02	22.90±3.29
EONML (%)	62.65±2.58 ^b	63.25±3.31 ^b	72.49±2.60 ^a	65.54±2.80 ^{ab}
EONMI (%)	7.75±2.02	6.23±1.66	5.97±0.99	5.86±1.33
JCA (%)	23.93±2.29	28.05±2.84	25.16±3.03	25.30±2.30
JCB (%)	51.15±2.40 ^{ab}	46.51±3.78 ^b	55.34±3.07 ^a	50.62±2.90 ^{ab}
JCI (%)	24.93±2.47	25.50±2.90	19.52±2.60	24.09±2.86
ALMI (%)	5.51±0.67	9.58±5.35	4.04±0.58	4.39±0.63
ALML (%)	45.31±1.81	45.72±1.93	46.63±2.36	46.74±1.82
AIML (%)	40.37±2.07	40.66±1.69	38.58±1.97	39.41±1.82
AIMI (%)	8.82±1.02	9.34±1.12	10.73±2.09	9.49±1.17

a, b, c: Diferentes sobrescritos na mesma linha indicam diferenças estatísticas (p<0.05).