HENRIQUE FULANETI CARVALHO

**Avaliação da adição dos protetores celulares mio-inositol e ácido
ferúlico ao meio de congelação na qualidade do sêmen
criopreservado de equinos**

São Paulo
2013

HENRIQUE FULANETI CARVALHO

**Avaliação da adição dos protetores celulares mio-inositol e
ácido ferúlico ao meio de congelação na qualidade do sêmen
criopreservado de equinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2013

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 Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2876
FMVZ

Carvalho, Henrique Fulaneti

Avaliação da adição dos protetores celulares mio-inositol e ácido ferúlico ao meio de congelamento na qualidade do sêmen criopreservado de equinos / Henrique Fulaneti Carvalho. -- 2013.

68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. DCFH-DA. 2. Resazurina. 3. Criopreservação. 4. Garanhão. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da eficácia de promotores da longevidade celular sobre as características espermáticas do sêmen criopreservado de equinos", protocolado sob o nº 2942/2013, utilizando 4 (quatro) cavalos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Effectiveness evaluation of cellular longevity promoters on sperm characteristics of stallion cryopreserved semen", protocol number 2942/2013, utilizing 4 (four) horses, under the responsibility Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CARVALHO, Henrique Fulaneti

Título: Avaliação da adição dos protetores celulares mio-inositol e ácido ferúlico ao meio de congelação na qualidade do sêmen criopreservado de equinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. : _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais Ronaldo O. Carvalho e
Sueli F. Carvalho e meus irmãos:
Rodolfo F. Carvalho e Leticia F.
Carvalho que deram apoio e mais uma
vez não mediram esforços para que
fosse possível mais uma vitória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me conduzido em momentos de muita dúvida e me dado a direção. Obrigado meu Senhor pelas dificuldades, que me serviram como estímulo para busca da superação. Obrigado pelas vitórias, pois aumentaram minha confiança em ti e me ajudarão a superar qualquer dificuldade.

Obrigado ao meu orientador Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda pela grande oportunidade, pelos incontáveis ensinamentos, por me incutir o comportamento profissional e uma atitude diferenciada, tal qual um médico veterinário exemplar deve demonstrar perante a sociedade.

A minha família: pai, mãe e irmãos por fazerem o possível e impossível por mim, pelos seus esforços sem limites e sacrifícios diários que nunca conseguirei retribuir à altura. Agradeço à Juliene Novais por ter guardado seu amor e me confiado seu coração mesmo passando por momentos de dificuldade e pela grande distância. Obrigado também à Brenda Santos sempre disposta a ajudar. Agradeço à Prof. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, por ter atuado como uma coorientadora. Obrigado Juliana Nascimento e André Furugen de Andrade pela paciência, ensinamentos e a confiança em mim depositada enquanto eu ainda era estagiário. Obrigado a todos amigos do VRA e pós-graduandos: Guilherme Pugliese pela grande ajuda com a estatística; Fernanda Jordão, Juliana Diniz, Julianne Naves, Ticiano Leite, Gisele Mouro, Saara Scolari, Angela, Estela Araújo, Mariana Rodrigues, Mariana Sponchiado; Everton Lopes; Bruna Oliveira, Julianne Naves; Renata Lançoni, Gabriel de Carli, Leonardo Batissaco e João Diego de Agostini por ser atencioso e me hospedar em sua casa.

Em especial aos amigos da casa do VRA. Obrigado por ter convivido com vocês e ter aprendido um pouco com cada um. Kleber Lemes por sempre estar ao meu lado, companheiro diário por mais de 2 anos; Daniela Franco da Silva pela amizade, auxílio no dia a dia e estímulos positivos; Guta (Dra. Maria Augusta Alonso) pela amizade, ensinamentos e por ter revisado e dado sugestões sobre esta dissertação; Maíra Bianchi Alves grande amiga, companheira e muito organizada; Milton Maturana sempre presente e disposto a ajudar; Thiago Santin muito companheiro e trabalhador; Moana França sempre divertida e procurando ser correta em suas atitudes, Milena sempre transmitindo paz e sorrisos por onde passa; Roney pela amizade e trocas de experiências; Roberta Harue divertida e companheira; Shirley, muito focada e esforçada.

Agradeço aos professores do VRA de Pirassununga: Ed Hoffman, Annelise Traldi, Mário Binelli e aos professores do VRA de São Paulo pelo convívio, troca de experiências e conhecimentos transmitidos.

Não posso nunca me esquecer de agradecer os moradores da república Tatu Corrido por me receberem em sua casa quando cheguei em Pirassununga, em especial Virgílio Nunes. E ao Fábio Pinese e Gustavo Vancetto pela ajuda no começo do mestrado.

Obrigado também ao Danilo Vigarani e sua família por me acolherem em São Paulo, pela amizade de muitos anos que a distância não destrói.

Funcionários do VRA: José Maria, João Carlos e Márcio de Carli. Obrigado à Sandra Tucumantel e Alexandra de Oliveira, sempre solícitas e preocupadas com a organização da casa do VRA.

“Aquele que anda com os sábios será cada
vez mais sábio”
Provérbios 13:20

RESUMO

CARVALHO, H. F. **Avaliação da adição dos protetores celulares mio-inositol e ácido ferúlico ao meio de congelamento na qualidade do sêmen criopreservado de equinos.** [Evaluation of the addition of cell protectors myo-inositol and ferulic acid to the cryopreservation medium on equine thawed sperm quality]. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A criopreservação do sêmen é de muita importância para a produção de equinos pois permite o amplo comércio internacional de sêmen e a redução dos custos com transporte de animais. Entretanto, o sêmen criopreservado apresenta reduzida longevidade e integridade funcional, um obstáculo para a expansão dessa técnica. Recentes descobertas sugerem que os maiores danos durante a criopreservação de sêmen de garanhões ocorrem devido ao desequilíbrio osmótico e às espécies reativas de oxigênio. Um método para combater os efeitos deletérios da congelamento é utilizar substâncias que possam amenizar os danos subletais. O objetivo desse experimento foi avaliar o efeito da adição de duas substâncias com efeito protetor celular (mio-inositol e ácido ferúlico) ao meio de congelamento, na qualidade do sêmen criopreservado de garanhões. Para isso foram realizadas 5 colheitas de sêmen de 5 garanhões. O sêmen foi processado para criopreservação e antes do envase foi dividido em 3 tratamentos: controle, mio-inositol (30mM) e ácido ferúlico (160 μ M). As palhetas foram descongeladas e analisadas quanto a motilidade computadorizada (CASA), integridade de membrana, estado metabólico e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em microscopia de epifluorescência nos tempos 0, 2 e 4h de incubação a 37°C. Previamente foram realizadas validações da técnica de mensuração simultânea da membrana plasmática e estado metabólico (sondas PI, H33342 e resazurina) e correlação entre duas técnicas de mensuração de EROs (DCFH-DA e DCFH-DA com H33342). Os dados obtidos foram avaliados no programa SAS, versão 9,3 (SAS, 2011) utilizando ANOVA e medidas repetidas no tempo, para as validações foram realizadas regressões lineares simples. A adição de mio-inositol no diluidor de congelamento resultou em maior motilidade total no tempo 2h e 4h e maior motilidade progressiva nos tempos 0 e 2h de incubação pós-descongelamento em relação aos outros grupos. O tratamento com mio-inositol resultou em maior quantidade de células com membrana plasmática íntegra nos tempo 0h (53,3 $\pm$ 1,4%); 2h (50,0 $\pm$ 1,0%) e 4h (37,9 $\pm$ 1,5%) de incubação que o grupo controle: 0h (48,0 $\pm$ 1,0%); 2h (44,9 $\pm$ 1,1%); e 4h (31,5 $\pm$ 1,7%). O ácido ferúlico prejudicou as características de motilidade (CASA) e a integridade da membrana

plasmática, entretanto melhorou o estado metabólico em todos os tempos. Conclui-se que o mio-inositol melhora as características de motilidade e a integridade de membranas espermáticas do sêmen criopreservado de equinos e que o ácido ferúlico apesar de prejudicar essas características promove melhor metabolismo espermático, mensurado pela técnica de redução da resazurina.

Palavras-chave: DCFH-DA. Resazurina. Criopreservação. Garanhão.

ABSTRACT

CARVALHO, H. F. Evaluation of the addition of cell protectors myo-inositol and ferulic acid to the cryopreservation medium on equine thawed sperm quality. [Avaliação da adição dos protetores celulares mio-inositol e ácido ferúlico ao meio de congelamento na qualidade do sêmen criopreservado de equinos]. 2013. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Sperm cryopreservation is of great importance for equine production, it assists in the international semen trade and reduce costs with animal transportation. However, frozen/thawed semen has reduced longevity and functional integrity and these is an obstacle to the expansion of this technique. The improvement in quality of cryopreserved semen is very important, especially to help become available more widely new technologies, such as sperm sexing. Recent findings suggest that the greatest damage during cryopreservation of stallion semen occur due to osmotic imbalance and the reactive oxygen species (ROS). One method to mitigate the deleterious effects of freezing is using substances that might lessen the sublethal damage. The objective of this experiment was to evaluate the quality of frozen/thawed stallion sperm after using two substances that have protective effects in the freezing medium: myo-inositol and ferulic acid. Were performed five sperm collection of 5 stallions. The semen was processed and before cryopreservation it was divided into three treatments: control, myo-inositol (30 mM) and ferulic acid (160 mM). The straws were thawed and analyzed at 0, 2 and 4 h of incubation time at 37°C. It was performed computerized motility (CASA), membrane integrity, metabolic status and ROS production using an epifluorescence microscope. Before beginning of the experiment were carried out validations of the technique of simultaneous assessment of plasma membrane and metabolic state (PI probes, H33342 and resazurin) and correlation between two measurement techniques ROS (DCFH-DA and DCFH-DA with H33342). The data were analyzed using the SAS version 9.3 (SAS, 2011) with ANOVA and repeated measures. For the probes validation were used linear regressions. The addition of myo-inositol in the freezing extender resulted in higher total motility in time 2h and 4h and increased progressive cells at 0 and 2 h of incubation post-thaw compared to the other groups. Treatment with myo-inositol resulted in a higher number of cells with intact plasma membrane in time 0h ($53.3 \pm 1.4\%$); 2h ($50.0 \pm 1.0\%$) and 4h ($37.9 \pm 1.5\%$) of incubation than the control group: 0h ($48.0 \pm 1.0\%$), 2h ($44.9 \pm 1.1\%$), and 4h ($31.5 \pm 1.7\%$). The use of ferulic acid resulted in the worst characteristics of

motility (CASA) and plasma membrane integrity, however improved metabolic status at all incubation times. It is concluded that myo-inositol improves sperm motility characteristics and preserves membrane integrity of equine cryopreserved semen. Ferulic acid although impairing these characteristics, promotes better sperm metabolism, measured by resazurin test.

Keywords: DCFH-DA. Resazurin. Cryopreservation. Stallion.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Taxa de prenhez por ciclo obtida por diferentes autores utilizando diferentes métodos	27
Tabela 2 - Médias $\pm$ erros padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra entre os tratamentos durante 3 tempos de incubação (0, 2 e 4 horas)	51
Tabela 3 - Médias $\pm$ erros padrão da porcentagem de espermatozoides com alto metabolismo analisado pela redução da resazurina sob microscopia de epifluorescência entre os tratamentos durante 3 tempos de incubação (0, 2 e 4 horas)	51
Tabela 4 - Médias das Características do movimento espermático medidos por CASA em três tempos de incubação e diferentes tratamentos.....	52

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Regressão linear entre tratamento e porcentagem de espermatozoides expressando alta concentração de EROs mensurados pela sonda DCFH-DA	47
Figura 2 -	Correlação entre porcentagem de espermatozoides considerados com alta concentração de EROs mensurados por DCFH-DA e pela técnica de associação de DCFH-DA + Hoechst 33342, em microscopia de epifluorescência.....	48
Figura 3 -	Regressão linear entre tratamento e porcentagem de células expressando redução da resazurina	48
Figura 4 -	Porcentagem de células consideradas com alta concentração de EROs nos diferentes tratamentos no tempo 0h de descongelação	49
Figura 5 -	Porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e alto metabolismo nos diferentes tratamentos durante 3 tempos de incubação (0, 2, 4 horas).....	50
Quadro 1-	Classificação de espermatozoides de acordo com sua fluorescência emitida utilizando associação de sondas	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micrômetro
AFE	ácido ferúlico
ALH	amplitude lateral de cabeça
ATP	adenosina trifosfato
BCF	frequência de batimento flagelar
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
DCFH-DA	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DNA	ácido desoxirribonucleico
EROs	espécies reativas de oxigênio
IA	inseminação artificial
h	hora
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
H33342	Hoechst 33342
Hz	Hertz
LIN	linearidade
mg	miligrama
min	minuto
MIO	mio-inositol
mM	milimolar
MP	motilidade progressiva
MPI	membrana plasmática íntegra
MT	motilidade total
nm	nanômetro
P	probabilidade
PI	iodeto de propídio
PROC	procedimento
r	coeficiente de correlação
R^2	coeficiente de determinação
RAP	células rápidas
RES	resazurina

SAS	Statistical Analysis System
STR	retilinearidade
T0	tempo 0 hora
T4	tempo 4 horas
T8	tempo 8 horas
VAP	velocidade média do trajeto
VCL	velocidade curvilínea
VSL	velocidade progressiva
MIAM	células com membrana plasmática íntegra e alto metabolismo
MIBM	células com membrana plasmática íntegra e baixo metabolismo
MLAM	células com membrana plasmática lesada e alto metabolismo
MLBM	células com membrana plasmática lesada e baixo metabolismo

LISTA DE SÍMBOLOS

-	menos
%	por cento
/	por
:	para (1:1)
<	menor
=	igual
±	mais ou menos
®	marca registrada
°C	graus Célsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Criopreservação do espermatozoide equino	22
2.2 Composição da Membrana Plasmática	25
2.3 Fertilidade do sêmen equino criopreservado	26
2.4 Danos causados pela criopreservação	29
2.5 Estresse osmótico	30
2.6 Longevidade do sêmen congelado	33
2.7 Avaliação do metabolismo espermático utilizando a sonda resazurina	35
2.8 Mio-inositol e Ácido ferúlico	37
3 CAPÍTULO 1- AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DOS PROTETORES CELULARES MIO-INOSITOL E ÁCIDO FERÚLICO AO MEIO DE CONGELAÇÃO NA QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE EQUINOS	39
3.1 Introdução	39
3.2 Materiais e métodos	40
3.2.1 Animais e colheitas de sêmen	40
3.2.2 Reagentes e meios	41
3.2.3 Processamento do sêmen e criopreservação	41
3.3 Experimento 1: validações das técnicas com sondas fluorescentes	42
3.3.1 Validação da técnica de mensuração de espécies reativas de oxigênio (EROs)	42
3.3.2 Validação da mensuração simultânea do metabolismo e membrana plasmática por associação de sondas	43
3.4 Experimento 2: Criopreservação com adição de mio-inositol e ácido ferúlico	44
3.4.1 Delineamento experimental e tratamentos	44
3.4.2 Teste de longevidade	45
3.4.4 Análise simultânea do metabolismo e membrana plasmática	45
3.4.5 Análise computadorizada da motilidade espermática (CASA)	46
3.4.6 Análises estatísticas	46
4 RESULTADOS	47
4.1 Experimento 1	47
4.1.1 Validação da técnica de mensuração de espécies reativas de oxigênio (EROs)	47
4.1.2 Análise simultânea do metabolismo e membrana plasmática	48
4.2 Experimento 2	49
4.2.1 Mensuração das espécies reativas de oxigênio	49

4.2.2 Análise simultânea do metabolismo e membrana plasmática.	50
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial com sêmen criopreservado é cada vez mais utilizada na reprodução equina devido suas inúmeras vantagens: diminui custos com transporte de éguas e garanhões, podem-se utilizar garanhões que estejam em competição, o sêmen fica disponível para ser utilizado no tempo desejado, possibilita o uso de garanhões importados e a utilização de gametas de animais impossibilitados para colheita de sêmen ou mortos (SAMPER; MORRIS, 1998; SIEME; HARRISON; PETRUNKINA, 2008).

Mesmo com tantas vantagens, o uso do sêmen criopreservado ainda não é largamente difundido devido à grande variabilidade na qualidade do sêmen entre garanhões e ejaculados do mesmo garanhão. Também é necessário um acompanhamento mais preciso das éguas, para que a inseminação ocorra o mais próximo da ovulação. Isso se deve à reduzida longevidade do sêmen descongelado (BARBACINI et al., 2000).

A criopreservação causa grandes danos ao espermatozoide, sendo estes devido ao estresse osmótico, provocado pela criopreservação, um dos responsáveis pela reduzida qualidade espermática (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012; MORILLO RODRIGUEZ et al., 2012). Os danos subletais também são ditos como responsáveis pela rápida perda da motilidade e integridade de membranas (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009).

As espécies reativas de oxigênio causam efeito deletério na qualidade espermática, desse modo, antioxidantes são investigados na melhora do sêmen criopreservado. Há evidências de que o processo de criopreservação pode ser melhorado, adicionando ao diluidor de criopreservação substâncias antioxidantes ou com efeito protetor celular (POJPRASATH et al. 2011; GIBB et al., 2013).

O ácido ferúlico é um potente antioxidante e atua na proteção celular, prevenindo a apoptose. Tem sido estudado na terapia para muitas doenças como diabetes, câncer e doenças neurodegenerativas (LANZAFAME et al., 2009). O mio-inositol é um regulador osmótico e demonstra ação antioxidante, atua na manutenção da osmolaridade celular e proteção do DNA espermático (BUCAK; TUNCER; SARIOZKAN, 2010; CONDORELLI et al., 2012).

O objetivo desse trabalho foi buscar contornar os efeitos deletérios que o processo de criopreservação causa. Para isso foi avaliado o efeito dos citoprotetores mio-inositol e ácido ferúlico ao meio de criopreservação na qualidade espermática de sêmen criopreservado de equinos. A hipótese é que essas substâncias promovem melhora na integridade de membranas

espermáticas e nas características de motilidade analisadas por sistema computadorizado (CASA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criopreservação do espermatozoide equino

A criopreservação do sêmen é uma biotécnica que, juntamente com a inseminação artificial, tem grande importância na difusão de linhagens genéticas de animais superiores; permite a utilização de sêmen sexado (YOSHIDA, 2000) e viabiliza por longo tempo, recursos genéticos, raças raras e animais ameaçados de extinção (CHENG et al., 2004).

O sucesso da utilização dessa biotécnica promoveu condições excepcionais para a larga expansão da inseminação artificial e outras tecnologias de reprodução assistida, incrementando a produtividade dos rebanhos em todo o mundo (FOOTE, 2002). Na espécie equina, o uso do sêmen criopreservado reduz os custos com transporte de animais e também os riscos de disseminação de doenças, facilita o acesso ao material genético que outrora estaria indisponível, como de garanhões de outros países (BRINSKO; VARNER 1992). Na espécie equina, o primeiro relato de criopreservação do sêmen data de 1957 por Barker e Gandier, com sêmen do epidídimo de um garanhão que foi castrado. E mesmo após tantos anos e muitos estudos realizados ainda não há uma padronização dessa tecnologia, ocorrendo muitas diferenças entre laboratórios. Isso se deve aos variados fatores envolvidos na técnica e nenhum elemento chave foi estabelecido até então (SAMPER; MORRIS, 1998; SIEME; HARISSON; PETRUNKINA, 2008).

A técnica de congelação inclui as seguintes etapas: diluição do sêmen fresco, centrifugação, adição do diluidor de congelação, refrigeração, preenchimento das palhetas e congelação. Essa sequência varia na literatura bem como a temperatura que cada uma é realizada (VIDAMENT et al., 2000).

O uso do sêmen congelado em equinos tem encontrado limitações. Primeiro pela inconstância encontrada na qualidade espermática entre garanhões e ejaculados. E, segundo, pela reduzida fertilidade de alguns garanhões (VIDAMENT et al., 1997; KUISMA et al., 2006). As diferenças entre os garanhões tem sido considerada uma grande barreira, visto que o sêmen dos reprodutores podem ser divididos em: não congelável, pobre, moderada e boa congelabilidade (congelabilidade se refere à porcentagem de ejaculados resultando em $\geq 35\%$ de motilidade total pós-descongelação) de acordo com Vidament et al. (1997).

Foi estimado que 30% dos garanhões produzem sêmen que apresenta boa congelabilidade, 40% aceitáveis em condições específicas e 30% dos animais apresentam uma pobre congelabilidade. (VIDAMENT, 2005). Entretanto, de acordo com Mennick (1997) garanhões que foram aprovados por exame andrológico dificilmente são verdadeiramente “poor freezers”, é apenas uma questão de se encontrar um diluidor mais eficaz para esse garanhão.

Essa variabilidade levou à serem propostos a utilização de protocolos diferenciados para cada garanhão (HOFFMANN et al., 2011). Arruda (2000) encontrou efeito de interação entre garanhão e diluidor de criopreservação nos resultados de características do movimento espermático, morfometria da cabeça dos espermatozoides e qualidade das membranas espermáticas, demonstrando que uma combinação específica de diluidor e crioprotetor pode apresentar melhor resultado para um garanhão individualmente. Os mecanismos responsáveis por essa diferença na sensibilidade ainda não são completamente conhecidos, possivelmente de origem genética, pois não ocorreu uma pressão de seleção para boa congelabilidade assim como nos bovinos (KUISMA et al., 2006), ou da inexistência de um protocolo ótimo para ser usado em geral para todos os garanhões (SAMPER; MORRIS, 1998).

Existem várias formulações de diluidores de criopreservação. Um tipo básico de diluidor é composto principalmente por leite em pó, glicerol e gema de ovo (BURNS, 1992; BURNS; REASNER, 1995). Com o avanço nas pesquisas novos diluidores formulados com meios quimicamente definidos foram desenvolvidos, substituindo os componentes de origem animal como leite e gema de ovo, que são muito variáveis em sua composição. Isso permite maior biossegurança e facilita o comércio internacional. O leite pode ser substituído pela fração de caseínas purificadas (MAGISTRINI, et al., 1996; FAYRERHOSKEN et al., 2008) e pela soja (PAPA et al., 2011), e a gema de ovo substituída pelo plasma de gema de ovo esterilizado (PILLET et al., 2011).

Entretanto, para que a motilidade e a fertilidade do sêmen criopreservado sejam otimizadas principalmente em garanhões que apresentam baixa congelabilidade, diversas substâncias têm sido investigadas: dimetilsulfoxido (SQUIRES; KEITH; GRAHAM, 2004); amidas (ALVARENGA et al., 2005); aminoácidos: glutamina (KHLIFAOU et al., 2005) açúcares: sorbitol (POJPRASATH et al., 2011) e colesterol (MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005). Também há a necessidade de substituir a gema de ovo por elementos quimicamente definidos e porque há nela substâncias que podem interferir negativamente na motilidade espermática (PACE; GRAHAM, 1974; MOUSSA et al., 2002). As principais desvantagens do uso da gema de ovo no diluidor de congelação de garanhões são: componente de origem animal

que representa risco de contaminação por bactérias que possam interferir na fertilidade; é um produto complexo de composição variável e apresenta dificuldade no seu armazenamento (PILLET et al., 2011).

Pesquisadores demonstraram o efeito benéfico da utilização de lipídios nos meios de criopreservação afetam o comportamento da membrana plasmática dos espermatozoides (GRAHAM; FOOTE, 1987; HE, 2001; RICKER et al., 2006). Diversos métodos tem sido utilizados para modificar a composição lipídica das membranas celulares, incluindo manipulação da biossíntese e suplementação alimentar (LOGUE et al., 1998). Um dos métodos utilizados para manipular os lipídios da membrana plasmática dos espermatozoides é a adição de lipídios purificados da gema de ovo (GRAHAM; FOOTE, 1987; PILLET et al., 2012)

O espermatozoide de garanhões apresentam uma diferença significativa na habilidade em suportar a congelação/descongelação, sugerindo diferenças bioquímicas e estruturais entre os animais (MEYERS, 2005). Um fator que pode ser responsável pelas diferenças entre garanhões em resposta à congelação é a composição das membrana plasmática dos espermatozoides. No estudo de Brinsko et al. (2007), foi encontrado valor entre 0,61 a tão alto quanto 1,2 na proporção de colesterol/fosfolipídios em garanhões férteis.

O efeito do garanhão nos resultados de congelabilidade são bem descritos. Utilizando o mesmo processo, com o mesmo diluidor de congelação, a diferença de qualidade espermática entre os animais são acentuadas. Essas variações também são observadas nos resultados de fertilidade, demonstrando claramente que alguns garanhões apresentam bons resultados, mesmo com baixas doses inseminantes. Morris, Tiplady e Allen (2003) inseminaram com 14×10^6 de espermatozoides móveis em palheta de 0,5 no corpo do útero e obtiveram 67% de concepção por ciclo.

Fatores presentes no plasma seminal como proteínas e eletrólitos têm sido investigados para tentar identificar diferenças entre animais férteis e subférteis. Entretanto há muita variação entre animais, ejaculados e frações do ejaculado (KARESKOSKI et al., 2005). O papel do plasma seminal como efeito negativo na qualidade do sêmen criopreservado também é motivo de investigação. Foi demonstrado que quanto menos plasma seminal, melhor é a congelabilidade, principalmente em garanhões sensíveis à congelação. Entretanto a presença do plasma seminal parece ser necessária para o espermatozoide, devendo portanto não ser retirado totalmente (KARESKOSKI; KATILA, 2008).

2.2 Composição da Membrana Plasmática

O conteúdo da membrana plasmática do espermatozoide difere de espécie para espécie. Basicamente ela é composta por fosfolipídios, colesterol, proteínas e glicolipídios. A membrana plasmática encobre totalmente o espermatozoide e é caracterizada por sua composição diferenciada em cada região das células, assim, apresenta uma heterogeneidade na constituição lipídica e glicoproteica (PESCH; BERGMANN, 2006). O colesterol tem o papel principal em controlar a fluidez das membranas dos fosfolipídios, promovendo uma estrutura coerente, estável em uma ampla variação de temperatura, prevenindo o rearranjo dos fosfolipídios (MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005; WASSALL; STILLWELL, 2009).

Trabalhos têm mostrado que há uma relação entre quantidade de colesterol e fosfolipídios da membrana espermática e susceptibilidade à congelação e que essa relação, quando maior que 0,5 (colesterol: fosfolipídios) confere maior resistência aos espermatozoides (POULOS; DARIN-BENNETT; WHITE, 1973; DARIN-BENNETT; WHITE, 1977). Outro fator estudado é o tipo dos ácidos graxos que compõe os fosfolipídios da membrana plasmática levando a estabelecer uma proporção de ácidos graxos poli-insaturados/saturados (PARKS; LYNCH, 1992). Espermatozoides com alto grau de ácidos poli-insaturados nos fosfolipídios tendem a ser mais susceptíveis aos danos da congelação, que são causados por perdas dos constituintes lipídicos da membrana espermática (CHAKRABARTY et al., 2007).

Quando se comparam as características celulares de diferentes espécies em relação a sua resistência à congelação, os espermatozoides do coelho e do homem são os que apresentam maior resistência ao processo de criopreservação. Nessas espécies os espermatozoides apresentam baixo grau de ácidos graxos insaturados e alta porcentagem de colesterol (POULOS; DARIN-BENNETT; WHITE, 1973). No touro e no galo é encontrado maior razão de fosfolipídios de colina/fosfolipídios de etanolamina. Os fosfolipídios de etanolaminas são mais susceptíveis em serem sequestrados durante sua fase de transição às baixas temperaturas. O cachorro e o ganhão são as espécies que mais apresentam quantidades de etanolamina, fazendo com que sejam menos resistentes (PARKS; LYNCH, 1992).

Essas observações levaram a buscar uma modulação na conformação lipídica nos espermatozoides de ganhões visando promover maior resistência das células ao processo de congelação. A incorporação de colesterol por meio de ciclodextrinas para o interior da membrana plasmática ocasionou aumento de espermatozoides com membrana intacta (ZAHN,

PAPA e DELL'AQUA, 2002; MOORE; SQUIRES; GRAHAM, 2005; GLAZAR et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010). Também foi observada melhora na motilidade e nas membranas espermáticas de espermatozoide provenientes do epidídimo (PAMORNSAKDA et al., 2011). Apesar de Moore, Squires e Graham (2005) obtiverem maior número de células ligadas em ocócitos, Zahn, Papa e Dell'aqua Jr (2002) obtiveram menor taxa de prenhez e atribuíram à influência negativa do colesterol na reação acrossômica. Esse efeito também foi confirmado por Oliveira et al. (2010), entretanto não foi observado em touros (PURDY; GRAHAM, 2004). Um fator que pode interferir na adição de colesterol em equinos é que há muita variação entre os garanhões na proporção de colesterol/fosfolipídios e o excesso de colesterol interfere negativamente na reação acrossômica (BRINSKO et al., 2007).

2.3 Fertilidade do sêmen equino criopreservado

Vários fatores afetam a taxa de prenhez em equinos em um programa de inseminação artificial. Estes incluem fertilidade inerente às éguas e garanhões, tipo de sêmen utilizado: fresco, refrigerado ou congelado (SIEME et al., 2003).

Na literatura há muita variação nos resultados quando se refere à fertilidade do sêmen congelado. Isso devido à grande variabilidade nos estudos, utilizando diferentes métodos de inseminação. Também são inúmeras as desigualdades das doses inseminantes quanto à concentração, volume, quantidade e local da deposição do sêmen. No manejo das éguas também ocorrem variações: indução ou não da ovulação, tipo de agente indutor, inseminação pré ou pós-ovulação ou em tempo fixo depois de indução. (CRISTANELLI et al., 1984; PETERSEN; WESSEL; SCOTT, 2002; MORRIS, 2006). A tabela abaixo mostra a diferença entre os autores e os resultados obtidos em um programa de inseminação com sêmen criopreservado.

Tabela 1 - Taxa de prenhez por ciclo obtida por diferentes autores utilizando diferentes métodos

Referência	Dose inseminante	Local da IA	Prenhez/ ciclo
Volkman; Van Zyl, (1987)	175 x10 ⁶	Corpo do útero	44%
Lindsey et al. (2002)	5x10 ⁶	Junção útero-tubárica (histeroscopia)	37,5%
Morris et al. (2003)	14 x10 ⁶	Corpo do útero	67%
Vidament, (2005)	2 IA de 400x10 ⁶ (1 a cada 24h)	Corpo do útero	45%
Crowe et al., 2008	2 IA de 300x10 ⁶ (1 pré e 1 pós-ovulação)	Ponta do corno uterino	59,1%

Fonte: (CARVALHO,2013)

Quando se comparam os resultados de fertilidade entre sêmen refrigerado e congelado, a taxa de prenhez por ciclo é menor com sêmen congelado, entretanto os resultados no final da estação reprodutiva são semelhantes apesar de necessitar de no mínimo 2 ciclos para isso (SAMPER; HELLANDER; CRABO, 1991). Dessa maneira, o número médio de ciclos utilizados é aumentado quando se usa sêmen congelado, aumentando o manejo (SAMPER, 2001).

Apesar da maioria dos autores descreverem uma taxa de concepção por ciclo entre 30 a 60%, (SAMPER; HELLANDER; CRABO, 1991; GRAHAM, 1996; BARBACINI et al., 2000; SQUIRES, et al. 2006) e um resultado semelhante ao uso de sêmen refrigerado no final da estação de monta, alguns autores, isoladamente, relatam porcentagens muito acima da média. Reger et al. (2003) obtiveram taxa por ciclo e no final da estação de 76,4 e 86,6%, respectivamente. Crowe et al. (2008) obtiveram maiores taxas de prenhez por ciclo e estação com sêmen congelado (59,1 e 82,0%, respectivamente) contra (44%, 69,6%) com refrigerado. Esse último autor atribuiu esse resultado à baixa qualidade do sêmen refrigerado utilizado e que o método de inseminação empregado (uma IA pré e uma pós-ovulação) foi o fator de sucesso. Os resultados elevados nas taxas de concepção em alguns estudos são devido a fatores muito favoráveis, utilizando estudos não balanceados, garanhões com ótima qualidade de sêmen e poucas éguas inseminadas (BRINSKO, 2006).

Em geral, a dose recomendada para inseminação artificial com sêmen congelado é de 300x10⁶ (PICKETT; VOSS; SQUIRES, 2000). Entretanto, doses muito maiores tem sido utilizadas. Samper e Morris (1998) relataram 73% de prenhez utilizando 2 inseminações com altas doses de sêmen congelado (600x10⁶ espermatozoides espaçadas por 24 e 36h após GnRH).

Essa dose elevada nem sempre está disponível, sendo cada vez mais requerido inseminações com baixas doses. Morris et al. (2003) inseminaram com 14×10^6 espermatozoides móveis em palheta de 0,5 no corpo do útero e obtiveram 67% de concepção por ciclo, utilizando 86 éguas.

Visto que o número de doses de um determinado reprodutor é limitado, a inseminação com baixas doses é uma técnica muito interessante (MORRIS, 2006). Entretanto quando a dose testada foi ainda mais baixa (3×10^6) a inseminação por endoscopia na junção útero-tubárica foi mais vantajosa em obter prenhez (SAMPER; MORRIS, 1998). O desenvolvimento de técnicas de inseminação com baixa dose é muito válido quando se pensa em aumentar o número de éguas inseminadas com sêmen congelado ou na utilização do sêmen sexado (LINDSEY; BRUEMMER; SQUIRES, 2001). A inseminação profunda na ponta do corno uterino, utilizando um cateter longo e flexível tem sido muito utilizada tanto para sêmen fresco como sêmen congelado (BUCHANAN et al., 1999). O limite para a menor dose inseminante tem sido estudado e parece estar próximo de pelo menos 1×10^6 de células móveis (BRINSKO, 2006).

Uma dificuldade bem documentada no uso do sêmen congelado é a grande variação entre ganhões nos resultados de fertilidade. Samper (1991) obteve resultados de prenhez de 60 a 90% dependendo do ganhão.

O uso do sêmen congelado também é requerido em outras biotécnicas como transferência intrafalopiana de gametas. Nessa técnica, Carnevale et al. (2001) e Coutinho da Silva et al. (2004) evidenciaram que os resultados de fertilidade quando se utiliza sêmen congelado são menores que sêmen fresco, e especularam que talvez a presença do diluidor de congelação possa interferir na ligação do espermatozoide com a tuba uterina ou oócito, contribuindo para os resultados inferiores (13% sêmen refrigerado e 8% sêmen congelado).

O manejo das éguas deve ser diferenciado quando se lança mão de sêmen congelado. Como a longevidade dos espermatozoides pós-descongelação é encurtada as éguas devem ser monitoradas mais frequentemente para serem inseminadas próximo da ovulação. Se as éguas são monitoradas para que a inseminação ocorra não mais que 4-6 horas da ovulação, as taxas de concepção se assemelham quando inseminadas muito próximas da ovulação (METCALF, 2000). Um estudo de Barbacini et al. (1999) sugeriram que não há diferença significativa quando as éguas são inseminadas 6h antes ou depois da ovulação. Sieme et al. (2003), verificaram que uma única inseminação entre 12h antes e 12h após a ovulação resultaram em resultados de concepção semelhante quando as éguas foram inseminadas com duas ou três inseminações em intervalos de 24h.

2.4 Danos causados pela criopreservação

A criopreservação causa danos irreversíveis às células espermáticas resultando em uma significativa perda de viabilidade após esse processo (CLULOW et al., 2008; LOOMIS; GRAHAM, 2008). Os espermatozoides dos mamíferos são muito sensíveis à variação de temperatura. Essas alterações são mais evidentes na membrana plasmática e acrossomal, mas podem ocorrer em qualquer compartimento celular. Assim, resultam essencialmente em diminuição ou perda de vigor e motilidade, devido ao metabolismo alterado e perda de componentes celulares (AMANN; GRAHAM, 1993).

O problema da criopreservação não está na viabilidade celular a -196°C , mas sim nos danos em congelar e descongelar, provocando mudanças estruturais nos fosfolipídios de membrana (AMAN; PICKETT, 1987; WILLOUGHBY et al., 1996). Para que tenha êxito, deverá ocorrer um balanço entre dano induzido por excesso de água não congelada e dano por formação de gelo intracelular. Este processo é dependente das interações complexas entre diluidores, crioprotetores, taxa de congelação e descongelação (AMAN; PICKETT, 1987).

O espermatozoide é particularmente vulnerável às espécies reativas de oxigênio devido sua composição da membrana celular, que é rica em ácidos poli-insaturados. Além do mais apresenta um reduzido volume celular dificultando a disponibilidade de antioxidantes intracelulares (KOPPERS et al., 2008).

A criopreservação causa danos letais e subletais (WATSON, 2000). As modificações não-letais nas células sobreviventes do processo de congelação contribuem para a reduzida longevidade, diminuindo assim o tempo que o espermatozoide tem para a fertilização após IA (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009).

Outro fator que pode resultar em danos subletais é presença de espermatozoides mortos intercalados com os sobreviventes pós-descongelação. Esses mortos e danificados interferem nos vivos (PEÑA et al., 2011). Há evidências em bovinos de que espermatozoides mortos liberam enzimas que geram peróxidos, danificando outros espermatozoides ao seu redor (SHANNON; CURSON, 1972); isso também foi observado em equinos, demonstrando uma marcada perda na longevidade após a adição de espermatozoides lesados (TROKEY; MERILAN, 1982).

Os danos subletais não são causados somente pelas espécies reativas de oxigênio, mas principalmente pelo estresse à membrana plasmática derivados dos efeitos combinados do dano

osmótico, desidratação e mudanças na membrana plasmática devido a fase de transição. Isso resulta em uma célula mais frágil, com diminuída longevidade e morte celular rápida e progressiva (ALVAREZ; STOREY, 1993). Esses efeitos combinados com o dano físico da criopreservação impõem danos de natureza bioquímica. Um fenômeno similar à apoptose ocorre durante a criopreservação e diversos marcadores como por exemplo as caspases e translocação da fosfatidilserina foram detectados no sêmen de garanhões e outras espécies (PEÑA et al., 2011). Apesar de ser um evento fisiológico e com grandes diferenças entre indivíduos, a quantidade de células demonstrando apoptose foi aumentada após a criopreservação (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009).

A flora microbiana nos ejaculados de garanhões é abundante. Pesquisas indicam também que os agente microbianos exercem dano subletal (apoptose) afetando a qualidade do sêmen criopreservado, reiterando a necessidade de práticas apropriadas de higiene na colheita e processamento (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009).

2.5 Estresse osmótico

Recentes descobertas em criobiologia de espermatozoide equino sugerem que os maiores danos durante a criopreservação ocorrem devido ao desequilíbrio osmótico (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012; MORILLO RODRIGUEZ et al., 2012) e que a formação do gelo intracelular não ocorre nas curvas de congelação e descongelação usadas atualmente (MAZUR; LEIBO; SEIDEL JR., 2008). Outros autores também investigaram os efeitos do estresse osmótico em espermatozoides equinos (BALL; VO, 2001; POMMER; RUTLANT; MEYERS, 2002; MORRIS et al., 2007). Essa injúria é mais acentuada em equinos e suínos que em outros mamíferos pois demonstram uma limitada tolerância às variações osmóticas (BLANCO et al., 2008).

A capacidade do espermatozoide em responder à ajustes em seu volume de acordo com alterações osmóticas é influenciada por diversos fatores: composição dos fosfolipídios da membrana plasmática, permeabilidade à água, temperatura que ocorre a fase de transição dos lipídios, atividade da Na^+/K^+ ATPase, canais de íons e estrutura do citoesqueleto (POMMER; RUTLANT; MEYERS, 2002).

De acordo com a teoria osmótica, o movimento da água ocorrerá até que a pressão do citoplasma se iguale à pressão externa. E no processo de criopreservação essa mudança de pressão ocorre no interior da célula e em seu meio externo (SIEME; HARRISON; PETRUNKINA, 2008). O dano osmótico é causado pelas mudanças no volume celular devido diversas variações na osmolaridade que os espermatozoides devem suportar na congelação e descongelação e ao crioprotetor. À medida que a temperatura diminui, a água contida no meio extracelular solidifica-se resultando em um meio hiperosmótico. Depois disso, durante a descongelação, a água que antes estava congelada, começa a derreter, diminuindo a hipertonicidade (AMANN; PICKETT, 1987). A hipertonicidade induz uma rápida despolimerização da actina F e uma remodelação do citoesqueleto. Essa reorganização envolve uma família de moléculas sinalizadoras, as Rho GTPases, responsáveis fisiologicamente para a recuperação do volume celular (CORREA; THOMAS; MEYERS, 2007). O exato papel do citoesqueleto na osmoregulação não está elucidado mas provavelmente atua como um sensor de volume celular e também oferece proteção mecânica (PEÑA et al., 2011).

Uma curva ótima de descongelação possibilita melhor reidratação da célula com a mínima neoformação cristais de gelo intracelulares (AMANN; PICKETT, 1987). Alguns autores indicam curvas de descongelação muito mais rápidas que as utilizadas na prática. Bradford e Buhr (2002) utilizaram 75°C por 7 segundos e encontram melhor qualidade espermática pós-descongelação. Muiño et al. (2008), obtiveram melhor resultado de longevidade espermática em sêmen de touros quando descongelaram a 50°C por 15 segundos. Diferentes curvas de congelação, concentração e tipo do crioprotetor influenciam na tolerância espermática na descongelação.

Após essas variações osmóticas, os espermatozoides ainda devem resistir finalmente a mais um estresse hiposmótico: o contato com o útero, necessitando novamente uma fina regulação (CHEN et al., 2011). Em resumo, há uma desidratação na congelação e depois um aumento de volume das células na descongelação, forçando a membrana plasmática e o citoesqueleto (GUTIÉRREZ-PÉREZ et al., 2011). Sendo assim, os espermatozoides são submetidos a uma variedade de ambientes osmoticamente desafiantes, tanto *in vitro* como *in vivo*, causando efeitos deletério para essas células.

O espermatozoide demonstra uma rápida resposta à diminuição na pressão osmótica, mas o exato mecanismo ainda permanece obscuro. Autores tem demonstrado que a bomba de sódio/potássio não atua em meio hiposmótico (RODRIGUEZ-GIL; RIGAU, 1996), sendo portanto a célula dependente de outros mecanismos de controle osmótico.

Há algum tempo foi descoberta a família das aquaporinas, proteínas de membrana que permitem o rápido transporte de água pela célula e também transportam glicerol. A aquaporina 7 (AQP7) foi identificada em espermátides e espermatozoides de rato (ISHIBASHI et al., 1997). Recentemente Chen et al. (2011) evidenciaram o papel chave da Aquaporina 3 como reguladora da osmoadação durante a transição dos espermatozoides do trato reprodutivo masculino para o feminino. Apesar desse mecanismo de transporte de água ser descrito, ainda existem mecanismos a serem revelados, visto que animais com deficiência de Aquaporina 3 não são totalmente inférteis (CHEN et al., 2011).

O espermatozoide equino apresenta alta resposta osmorregulatória (MEYERS, 2005). Embora ele consiga retornar seu volume celular para níveis normais após sofrer variações osmóticas, seus compartimentos celulares são alterados irreversivelmente. Há diminuição na motilidade, potencial mitocondrial e alterações ultraestruturais nas membranas que podem ser identificadas somente com auxílio de microscopia de transmissão eletrônica (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012).

A osmolaridade normal para o espermatozoide está em torno de 300 mOsm. O limite máximo de tolerância para que os espermatozoides equinos mantenham a integridade e motilidade é de até 600 mOsm (BALL; VO, 2001; POMMER; RUTLANT; MEYERS, 2002; OLDENHOF et al., 2011). O efeito prejudicial do retorno para condições normais de osmolaridade são mais intensos que o da hiperosmolaridade em si (GIMORE et al., 1996) e o estresse provocado por condições hiposmóticas é mais prejudicial que por hiperosmóticas. Quando os espermatozoides foram incubados em 450mOsm/kg, o volume inicial celular foi reduzido para 89% e perdeu 30% da sua motilidade. Quanto mais se diminui a osmolaridade, mais marcados são os efeitos prejudiciais. Deste modo o espermatozoide equino após sofrer estresse osmótico, pode retornar a seu volume normal ($24,4 \mu\text{m}^3$) mas sua motilidade e integridade funcional das membranas ficam irreversivelmente prejudicados (POMMER; RUTLANT; MEYERS, 2002).

Os danos latentes, não aparentes quando avaliados por métodos usuais de análise de qualidade espermática, muitas vezes são chamados de danos subletais (ALVAREZ; STOREY, 1992). Seus efeitos são observados a longo prazo, principalmente na queda da longevidade celular e consequentemente, fertilidade (ALVAREZ; STOREY, 1993; WATSON, 2000). Muiño et al. (2008) evidenciaram esse efeito latente pós-descongelção em sêmen de touro. Demonstrando que logo após a descongelção não foi encontrada diferença entre os tratamentos (curvas de descongelção) mais após 2h de incubação a 37°C os efeitos dos danos latentes foram revelados pela diminuída longevidade.

2.6 Longevidade do sêmen congelado

Há muitos anos já foi observado que o sêmen criopreservado apresenta uma reduzida longevidade no trato reprodutivo feminino (MATTFNER et al., 1969). Essa condição é resultante de todos os danos acumulados pelo processo de criopreservação e os efeitos anteriormente citados. Entretanto também deve-se considerar que a congelação provoca efeitos similares a capacitação (WATSON, 1995). De acordo com Gliozzi, Luzi e Cerolini (2003), os espermatozoides de suínos perdem aproximadamente 50% do seu conteúdo de colesterol após a criopreservação. Isso pode ser um indício da similaridade com a capacitação, diminuindo a estabilidade da membrana plasmática e consequentemente a longevidade. Outro evento importante na capacitação espermática é o aumento do nível de cálcio intracelular. De acordo com Leopold et al. (2000) o sêmen criopreservado de garanhões apresentam maior concentração de cálcio intracelular que o sêmen fresco. Isso resulta em alterações na membrana e aumenta o nível de cAMP, desse modo diminuindo a longevidade dos espermatozoides (NEILD et al., 2005).

As alterações físicas e semelhantes à capacitação são talvez a razão pela diminuição da heterogeneidade da população de espermatozoides em uma dose inseminante. O relato de que éguas ficaram prenhes ao ovularem 6 dias após uma monta natural demonstra que o ejaculado de um determinado garanhão não é homogêneo. Uma larga população de espermatozoides é formada por pequenas subpopulações que se soltam do epitélio da tuba uterina ao longo do tempo, tendo assim células disponíveis para a fertilização independentemente do momento da ovulação. Entretanto essas subpopulações diminuem ao longo do tempo após uma colonização inicial da tuba uterina. (SAMPER, 2001).

A tuba uterina protege as células contra fagócitos da reação inflamatória e a ligação do espermatozoide à tuba uterina promove a manutenção da motilidade por tempo prolongado mantendo a integridade de membrana (BADER, 1982; THOMAS; BALL; BRINSKO, 1994). Espermatozoides que passaram pelo processo de criopreservação apresentam uma reduzida habilidade em se fixarem no epitélio da tuba uterina (DOBRINSKI; THOMAS; BALL, 1995) e um atraso em colonizar o ístimo (BADER, 1982), reduzindo ainda mais a longevidade. Essas informações revelam as razões do porquê de inseminar éguas o mais próximo da ovulação para aumentar a taxa de prenhez quando se utiliza sêmen congelado (SAMPER; MORRIS, 1998; BARBACINI et al., 2000; NEILD et al., 2005).

Em equinos é relatado um tempo de motilidade *in vitro* de 4 horas. Pojprasath et al. (2011) demonstraram que após 4 horas de incubação a média de motilidade foi de 9,8 a 12,5% dependendo da composição do diluidor utilizado para congelação. Esse tempo é extremamente curto quando se compara com a longevidade do sêmen fresco porém é mais preocupante saber que a qualidade espermática nesse tempo caiu abruptamente. Ainda nesse estudo, a funcionalidade da membrana diminuiu de 16% para 8,5% e a integridade de membrana de 46,9% para 26,5% ao longo de 4 horas de incubação. Isso revela o quanto que o processo de criopreservação e os procedimentos devem ser melhorados pra buscar uma melhora na longevidade espermática.

Um método de se melhorar os resultados da criopreservação é adicionar substâncias ao meio crioprotetor com conhecido efeito citoprotetor. Buscando contornar os efeitos da depleção e falha na regulação do cálcio intracelular que a criopreservação causa (ALHAIDER; WATSON, 2009; MORILLO RODRIGUEZ et al., 2012) acrescentaram um quelador intracelular de cálcio, visando obter melhor concentração desse íon dentro da célula pós-descongelação. Esse efeito foi alcançado entretanto só foi observado após a ressuspensão das células em meio Tyrode, demonstrando a complexidade de interações entre o meio e as células. Outra substância testada foi a quercetina, um antioxidante flavonoide que suprime a formação de superóxido e inibe a peroxidação lipídica. Esse composto melhorou a motilidade e o número de células ligadas na zona pelúcida pelo teste de ligação em oócitos bovinos. Essa substância também melhorou as características do congelado pós-sexagem (GIBB et al., 2013).

Outro modo de melhorar a qualidade espermática do sêmen congelado é acrescentar fármacos ou outras substâncias no diluidor pós-descongelação. Yamaguchi, Funahashi e Murakami (2009) descongelaram doses de sêmen e ressuspenderam em um meio modificado com cafeína e cálcio e obtiveram maior prenhez em suínos (71,4% contra 38,1%). Um experimento em nosso laboratório, diluindo sêmen pós-descongelação em meio Talp e adicionando 3,5 mM de pentoxifilina, resultou em maior motilidade total e progressiva após 120 minutos de incubação (MARQUES; ARRUDA; CELEGHINI, 2002).

Talvez uma saída para a reduzida longevidade seria a utilização de técnicas de seleção espermática pós-descongelação, retirando os espermatozoides mortos e com defeitos morfológicos ou funcionais (LOOMIS, 2006). Entretanto mais testes de fertilidade com um número maior de animais devem ser realizados. Sendo assim, com a melhoria da eficiência do uso do sêmen congelado e com o aumento nas taxas de concepção, inseminações com espermatozoides criopreservados se tornarão cada vez mais frequentes (MORRIS; ALLEN, 2002).

2.7 Avaliação do metabolismo espermático utilizando a sonda resazurina

O espermatozoide é uma célula única pois apresenta incapacidade de se dividir e limitada capacidade biossintética. Essas células não apresentam sistema de reparação ou síntese de novas enzimas. Entretanto a maioria de seus constituintes para função e metabolismo são sintetizados durante a espermatogênese, assim o espermatozoide somente realiza manutenção energética. A energia é utilizada para inícios de processos catabólicos, motilidade e manutenção do balanço iônico e funções diversas (MANN, 1964).

Aproximadamente 90% do substrato dessa célula provém do meio externo e é principalmente derivada de carboidratos. O espermatozoide rapidamente metaboliza monossacarídeos como a glicose e frutose, mas não todos os tipos de açúcares. O espermatozoide do garanhão apresenta limitada capacidade do uso da frutose, provavelmente porque não apresenta uma proteína carreadora de frutose para o interior da célula. Outros substratos usados pelo espermatozoide equino incluem: ácido láctico, glicerol, ácidos graxos e aminoácidos (STOREY, 2008)

A principal fonte de energia é o ATP que é produzido pela mitocôndria no processo de fosforilação oxidativa e a glicólise. Entretanto há muita diferença entre as espécies na utilização dessas duas vias energéticas. Em humanos o espermatozoide obtém uma grande proporção de seu ATP por meio da glicólise e ajusta sua demanda de energia aumentando o fluxo da via glicolítica (FORD; REES, 1990).

A criopreservação pode resultar em populações sobreviventes de espermatozoides com a estrutura geradora de energia danificada. Tais populações exibem certos graus de dano mitocondrial, resultando em baixo metabólito energético e excesso de perda de energia (OEHNINGER et al., 2000).

Os avanços científicos recentes como a análise computadorizada, uso de sondas fluorescentes e citometria de fluxo proporcionaram melhor avaliação do sêmen devido à maior repetibilidade atribuída a essas técnicas. Assim a análise da integridade estrutural dos espermatozoides se tornou mais criteriosa (ARRUDA, 2000; CELEGHINI, 2010). Kuisma et al. (2006) listou que o espermatozoide deve ter diversos atributos para fertilizar o oócito, e além de motilidade e membrana plasmática íntegra, também deve possuir um bom metabolismo para a produção de energia. A falha em detectar um desses atributos pode superestimar a qualidade

de uma amostra espermática. Portanto, é de grande importância a mensuração do estado metabólico.

Testes da atividade de redução de corantes pelas células são utilizados para avaliar a viabilidade e integridade do metabolismo dos espermatozoides. Esse tipo de teste pode ser feito com o corante resazurina (ZRIMSEK et al., 2004). O teste da redução da resazurina é um método para avaliar a capacidade metabólica dos espermatozoides. Ela é um indicador da atividade da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase que é uma enzima chave na reciclagem de NADP e NADPH (GLASS et al., 1991). Essa enzima converte a resazurina em diidroresorufina gerando uma mudança de cor visível na amostra ao longo do tempo, conforme ocorre a conversão, de azul para rosa e depois para incolor (WANG et al., 1998). O teste de redução da resazurina tem sido usado para avaliar a capacidade metabólica em espermatozoide de humanos e diversas espécies (MAHMOUD et al., 1994). A mensuração do estado metabólico por meio da mudança de coloração da amostra utilizando a resazurina demonstrou correlação significativa com o número de espermatozoides móveis na amostra de humanos. Quando as amostras apresentaram concentração acima de $20 \times 10^6/\text{mL}$, ocorreu mudança de coloração visualmente identificável (GLASS et al., 1991). Em espermatozoides de equinos também foi realizado esse teste resultando em uma acurácia 76% em identificar amostras com alto ou baixo potencial fertilizante (CARTER et al., 1998).

O teste da resazurina também foi correlacionado com testes mais sofisticados como a mensuração de ATP ($r = 0.65$, $P < 0.001$), entretanto é um teste mais barato (MAHMOUD et al., 1994). Outra característica da resazurina é que ela emite fluorescência após ser convertida por enzimas metabólicas. Essa qualidade pode ser explorada para melhorar a acurácia das análises (BATCHELOR; ZHOU, 2004). Dessa forma, pode ser analisada utilizando microscopia de epifluorescência (O'BRIEN et al., 2000) fluorímetro (MAGNANI; BETTINI, 2000) ou citometria de fluxo (PICHARDO et al., 2010).

2.8 Mio-inositol e Ácido ferúlico

O mio-inositol é uma molécula similar a molécula de açúcar, que por muito tempo foi considerado erroneamente como uma vitamina. Muitos estudos apoiam que o mio-inositol é um dos precursores da síntese de fosfatidilinositol, que são biomoléculas responsáveis pela transdução de sinais de regulação celular. O mio-inositol também desempenha papel importante

na morfogênese e formação da membrana celular, síntese lipídica e crescimento celular (CARLOMAGNO et al., 2011).

Outro papel do mio-inositol é atuar na regulação do cálcio intracitoplasmático, efeito muito importante na maturação oocitária e capacitação espermática (LOWTHER et al., 2009). Devido ao seu papel regulatório, inclusive na embriogênese, é crucial que haja biodisponibilidade do mio-inositol nos fluidos orgânicos, principalmente.

O mio-inositol tem sido utilizado na terapia de várias patologias como a síndrome do ovário policístico, atuando na recuperação da ovulação e regulação das alterações hormonais secundárias à essa patologia (GERLI; MIGNOSA; DI RENZO, 2003). Essa molécula também atua na terapêutica da menopausa, atuando na diminuição da pressão arterial e das lipoproteínas de alta densidade (GIORDANO et al., 2011).

A atuação do mio-inositol também é relatada em outros tipos de células, não só da esfera reprodutiva, mas também em neurônios. Essa substância atua como protetor osmótico e na homeostase das sinapses neuronais (MOORE ET AL., 1999). Seu papel principal no equilíbrio celular é devido sua ação regulatória nas mudanças de osmolaridade celular, promovendo adaptação de volume e consequentemente protege as funções celulares (MORIMURA et al., 1996).

Devido à sua ação osmoprotetora, o mio-inositol tem sido investigado na manutenção da integridade de embriões bovinos e espermatozoides humanos (HOLM et al., 1999; CONDORELLI et al., 2012) e na criopreservação de espermatozoides de espermatozoides bovinos (BUCAK et al., 2010).

Outra substância investigada com ação citoprotetora é o ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico, conhecido como ácido ferúlico. É um composto encontrado como constituinte estrutural da parede celular de vegetais e frutas (LANZAFAME et al., 2009; KOH, 2012). Sua principal ação é na proteção à peroxidação lipídica pois atua como potente antioxidante, reagindo com radicais peroxila, hidroxila, superóxido e ácido hipocloroso (SHNATHAKUMAR et al., 2012). Essa molécula tem sido utilizada no tratamento de diversas patologias como diabetes, câncer e neuropatias (LANZAFAME et al., 2009).

A ação do ácido ferúlico exercida em diversos tipos de células é na proteção celular contra radicais livres, aumenta a ação das enzimas antioxidantes intracelulares (CHOTIMARKORN; USHIO, 2008); apresenta ação anti-inflamatória e neuroprotetora (SUNG; KIM; KOH, 2012; ZENI et al., 2012).

O ácido ferúlico foi testado em espermatozoides de humanos e foi eficaz na manutenção da motilidade e proteção mitocondrial, aumentando os níveis de energia e diminuição da

peroxidação lipídica. Também foi testado na criopreservação de sêmen de bodes, uma forma natural de ácido ferúlico, e foi observado efeito antioxidante e redução de defeitos espermáticos (TUNCER et al., 2010).

3 CAPÍTULO 1- AVALIAÇÃO DA ADIÇÃO DOS PROTETORES CELULARES MIO-INOSITOL E ÁCIDO FERÚLICO AO MEIO DE CONGELAÇÃO NA QUALIDADE DO SÊMEN CRIOPRESERVADO DE EQUINOS

3.1 Introdução

A tecnologia da criopreservação do sêmen é de grande interesse para a produção equina. Essa técnica além de permitir a conservação do material genético de garanhões superiores e o comércio internacional de sêmen, também possibilita a redução dos custos com transporte de animais (LOOMIS; SQUIRES, 2005). Essas características fazem com que o sêmen criopreservado seja bastante aceito e poderá, inclusive, ultrapassar o número de inseminações com sêmen refrigerado em programas que utilizam sêmen transportado (LOOMIS, 2001). Entretanto, somente será possível quando incrementarem as taxas de fertilidade (ALVARENGA et al., 2005). Apesar dos resultados de fertilidade serem comparáveis ao do sêmen refrigerado (SQUIRES et al., 2006), isso não se aplica para todos os garanhões (SAMPER, 2001), demonstrando claramente que a diferença entre os garanhões ainda é um problema para a expansão dessa técnica (BLOTTNER et al., 2001). Há evidências de que mudanças no processo de criopreservação podem melhorar as características espermáticas de garanhões que apresentam baixa congelabilidade (ALVARENGA et al., 2003) podendo inclusive aumentar as taxas de fertilidade (MOFFET et al., 2003). A melhora na qualidade do sêmen criopreservado é muito importante, principalmente para disponibilizar de maneira mais ampla novas técnicas como por exemplo a sexagem espermática (MORRIS, 2005). O processo de criopreservação prejudica muito as células sendo a motilidade é diminuída irreversivelmente e os espermatozoides que sobrevivem apresentam reduzida longevidade (WATSON, 2000). O choque frio causa mudanças físicas e funcionais nos diversos compartimentos celulares (SIEME; HARISSON; PETRUNKINA, 2008). Recentes descobertas sugerem que os maiores danos durante a criopreservação ocorrem devido ao desequilíbrio osmótico e às espécies reativas de oxigênio (EROs) (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2012; MORILLO RODRIGUEZ et al., 2012). O estresse osmótico causa danos no citoesqueleto (CORREA; THOMAS; MEYERS, 2007), na mitocôndria, membrana plasmática (GARCÍA et al., 2012) e induz a geração de espécies reativas de oxigênio (MCCARTHY et al., 2010). Se essas injúrias pudessem ser contornadas, um incremento na qualidade espermática poderia ser atingido e

consequentemente na fertilidade, o que possibilitaria o uso do sêmen congelado em larga escala (PEÑA et al., 2011). Um método para combater os efeitos deletérios da congelação é utilizar crioprotetores intra e extracelulares (RODRÍGUEZ et al., 2011) ou substâncias que possam amenizar os danos subletais e similares à apoptose (RODRÍGUEZ et al., 2013).

Nesse experimento foi avaliado o efeito benéfico da adição, ao meio crioprotetor, duas substâncias: mio-inositol e ácido ferúlico. O mio-inositol é um ciclohexanohexol encontrado em nove isômeros sendo o mio-inositol mais distribuído amplamente nas células de mamíferos. Em condições de estresse celular, exerce função protetora (VALLURU; VAN DEN ENDE, 2011). Essa substância é normalmente observada em concentrações altas no epidídimo, principalmente na região da cabeça (PRUNEDA et al., 2007) além de também ser relatada a função de regulador osmótico em espermatozoides (SETYAWAN et al., 2009). O ácido ferúlico é um componente da parede celular de diversos vegetais e apresenta potente ação antioxidante (SHANTHAKUMAR et al., 2012). Demonstra também ação citoprotetora, prevenindo eventos apoptóticos (KOH, 2012) e modula níveis intracelulares de cálcio (SUNG; KIM; KOH, 2012). Também demonstrou aumentar a produção de energia de espermatozoides humanos (ZHENG; ZHANG, 1997).

Nesse sentido, o objetivo desse experimento foi adicionar ao processo de criopreservação substâncias que atuam na proteção celular com o intuito de que elas exerçam, de maneira preemptiva, uma contraposição aos danos resultantes do processo de congelação/descongelação.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Animais e colheitas de sêmen

Foram utilizados 5 garanhões com idades entre 8 e 24 anos. Os animais foram mantidos sob manejo nutricional e sanitário idênticos. Antes do início do experimento foram realizadas colheitas de sêmen a cada dois dias durante duas semanas para promover um nivelamento biológico. Para a colheita de sêmen foi realizada higiene do pênis dos garanhões com algodão e água morna (37°C), foram colhidos ejaculados por meio de vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma[®], Botucatu, SP), com temperatura interna de sua mucosa entre 42 e 45°C, 1 vez

por semana, totalizando 5 colheitas de cada garanhão. Foram usados somente ejaculados que apresentavam no mínimo 70% de motilidade e $\leq 30\%$ de defeitos totais.

3.2.2 Reagentes e meios

Todos os reagentes, quando não especificados, foram adquiridos da Sigma. Ácido ferúlico: foi preparada uma solução trabalho de 10 mM adicionando 0.0194g em volume final de 10mL de DMSO. Mio-inositol: solução trabalho de 1 M, adicionando 1,8g em 10mL de água deionizada. Peróxido de Hidrogênio. Solução trabalho de 3mM em PBS. DCFH-DA: solução trabalho de 1mM. Resazurina: foi preparada solução trabalho de 50 μ M em DMSO de acordo com o manual do fabricante (LIVE/DEAD[®] Cell vitality assay kit, Invitrogen) :Iodeto de propídio: 0,5mg/mL; Hoechst 33342: 2,5mg/mL.

3.2.3 Processamento do sêmen e criopreservação

Após a colheita o sêmen foi filtrado em filtro de nylon para descarte da fração gelatinosa. O sêmen foi então diluído a 1:1 em meio a base de leite desnatado (KENNEY, 1975). O sêmen diluído foi colocado em tubos cônicos tipo Falcon[®] de 15 mL e levados à centrífuga (FANEM Excelsa II[®]) e centrifugado a 600g por 10 min. Após a centrifugação foi mensurada a concentração espermática utilizando uma câmara de Neubauer. O sêmen foi então ressuspensionado em diluidor de criopreservação Botu-Crio[®] (Botupharma, Botucatu, SP) para atingir a concentração final de 200×10^6 /mL. Após a ressuspensão, as amostras foram divididas em tubos de micro centrífuga de 2 mL e então adicionados os tratamentos: 1) controle: 2 mL de sêmen diluído em Botu-Crio; 2) mio-inositol: 2 mL de sêmen diluído em Botu-Crio + 60 μ L da solução trabalho (concentração final de 30mM de mio-inositol); 3) ácido ferúlico: 2 mL de sêmen diluído em Botu-Crio + 30 μ L da solução trabalho (concentração final de 160 μ M de ácido ferúlico). Após a adição dos tratamentos o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL e foram congeladas por processo automatizado (TK 3000[®], TK tecnologia em congelação Ltda., Uberaba, MG). A máquina realizou inicialmente uma curva de refrigeração de 0,25°C/min até

atingir 5°C, posteriormente uma curva de congelação na taxa de 20°C/min até atingir -120°C, momento em que foram submersas diretamente em nitrogênio líquido. As palhetas foram guardadas em raques e acondicionadas em botijão de nitrogênio líquido.

3.3 Experimento 1: validações das técnicas com sondas fluorescentes

3.3.1 Validação da técnica de mensuração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A mensuração de EROs foi realizada em microscopia de epifluorescência adaptada de Rastogi et al. (2010). Para isso foi utilizada a sonda 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), uma sonda que é convertida em fluorescente pela ação das espécies reativas intracelulares. Foram testados dois métodos: apenas a adição de DCFH-DA ou em associação de DCFH-DA com Hoechst 33342. O segundo método é mais prático em se detectar as duas populações (verde= alto EROs e azul= baixo EROs), portanto foi realizado um teste de correlação entre os dois métodos.

Para validação foram utilizadas 4 colheitas de sêmen de 4 garanhões. O sêmen fresco foi diluído a 30×10^6 /mL em PBS para um volume final de 10 mL e adicionado 1,5 mL de solução trabalho a 20mM de H_2O_2 para concentração final de 3 mM de H_2O_2 . O sêmen foi então incubado a 5°C por 30h em bisnaga de inseminação artificial, visando induzir a produção de EROs. Após esse período nova colheita de sêmen foi realizada, do mesmo animal. A nova amostra foi diluída a 30×10^6 /mL em PBS e 3 alíquotas de 2mL foram preparadas com base quantidade de EROs: sêmen *in natura* (T0), sêmen induzido (T100) e uma mistura equivalente das duas últimas (T50). Foram adicionados 10µL de DCFH-DA (solução trabalho de 1mM) em uma alíquota de 300 µL de cada tratamento (T0, T50 e T100) e incubados por 30 min no escuro em banho-maria seco a 37°C e analisados em microscopia de epifluorescência (Nikon Eclipse 80i) utilizado um filtro de microscopia de epifluorescência de excitação 465-495nm e emissão 515-555nm, em aumento de 1000x. Foram contados 200 espermatozoides em duas categorias: alto EROs (coloração verde intensa) e baixo EROs (verde fraco). Simultaneamente foram preparadas alíquotas de 300µL das mesmas amostras originais (T0, T50, T100) e, além de acrescentar DCFH-DA, também foi acrescentado 5 µL de Hoechst 33342 a 2,5mg/mL. Essas amostras também foram analisadas em microscopia de epifluorescência mas para a análise

simultânea foi utilizando um filtro de banda tripla (D/F/R, C58420, formado pelos conjuntos: UV-2E/C de excitação 340-380 nm e emissão de 435-485; B-2E/C, excitação de 465-495nm; G-2E/C de excitação 540-525nm e emissão de 605-655nm) em aumento de 1000x. Foram divididos dois grupos diferentes: células com alto EROs apresentaram-se coradas em verde intenso e células com baixo EROs coradas em azul. Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão linear.

3.3.2 Validação da mensuração simultânea do metabolismo e membrana plasmática por associação de sondas

A validação foi realizada pelo mesmo método de Celeghini et al. (2007). Foram utilizados 3 ejaculados de 3 garanhões. O sêmen foi diluído na concentração de 30×10^6 em PBS. Uma alíquota de sêmen fresco foi submetida a 3 sucessivos ciclos de rápida congelação em nitrogênio e descongelação a 37°C (flash-frozen). Foram preparadas 3 tratamentos de cada ejaculado com base na proporção de células lesionadas por flash-frozen (T0= 100% sêmen fresco; T50= 50% sêmen fresco e 50% lesionado; T100= 100% lesionado). Após esse procedimento, os tratamentos foram divididos em alíquotas de 300 µL e submetidos à incubação simultânea com 3 sondas fluorescentes por 15 minutos em banho-maria seco a 37°C protegidos da luz. As sondas utilizadas foram: 5µL de Hoechst 33342, 3 µL de Iodeto de propídio e 6µL Resazurina. Após a incubação 6 µL foram colocados entre uma lâmina e lamínula e analisados sob microscopia de epifluorescência (Nikon Eclipse 80i) utilizando filtro para coloração tripla anteriormente especificado (D/F/R C58420). Foram contadas 200 células e divididas em 4 categorias (Quadro1).

Quadro 1- Classificação de espermatozoides de acordo com sua fluorescência emitida utilizando associação de sondas

Características	Sondas Fluorescentes		
	H33342	PI	RES
Membrana plasmática íntegra e alto metabolismo (MIAM)	+	-	+
Membrana plasmática íntegra e baixo metabolismo (MIBM)	+	-	-
Membrana plasmática lesada e alto metabolismo (MLAM)	-	+	+
Membrana plasmática lesada e baixo metabolismo (MLBM)	-	+	-

Notas: H33342= Hoechst 33342 (fluoresce de azul); PI= Iodeto de Propídio (fluoresce vermelho) e RES= redução da resazurina (fluoresce de vermelho a peça intermediária)

Fonte: (CARVALHO, 2013)

3.4 Experimento 2: Criopreservação com adição de mio-inositol e ácido ferúlico

3.4.1 Delineamento experimental e tratamentos

A unidade experimental foi considerada 1/3 do ejaculado. Foram utilizadas 5 colheitas de 5 garanhões. O experimento foi delineado em blocos casualizados, com arranjo fatorial de 3X3X5 (3 tratamentos, 3 tempos de incubação e 5 blocos), sendo cada garanhão considerado um bloco. Foram realizadas as colheitas de sêmen e procedimentos para a criopreservação e imediatamente após a ressuspensão com diluidor Botu-Crio, a amostra foi dividida em 3 tratamentos em tubos de micro centrífuga de 2mL: 1) controle: 2 mL de sêmen diluído em Botu-Crio; 2) mio-inositol: 2 mL de sêmen diluído em Botu-Crio +60µl da solução trabalho para completar uma concentração de 30mM; 3) ácido ferúlico: 2 mL de sêmen diluído em Botu-Crio + 30µL da solução trabalho para concentração final de 160 µM. Após a adição dos tratamentos o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 e criopreservado. As palhetas foram descongeladas a 37°C e mantidas nessa temperatura. As análises foram realizadas nos tempos 0, 2 e 4 horas pós-descongelação quanto às características motilidade no aparelho CASA, quanto à integridade de membrana plasmática e metabolismo sob microscopia de epifluorescência e EROs.

3.4.2 Teste de longevidade

Duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e diluídas para a concentração de $30 \times 10^6/\text{mL}$ em diluidor a base de leite desnatado (KENNEY, 1975) para um volume total de 2mL em tubo de micro centrífuga de 2mL e foi mantido incubado por 4h a 37°C. Após 10 minutos de interação com o diluidor, foram analisados em 3 tempos de incubação (0,2,4 horas) quanto às características de motilidade usando o aparelho CASA, análise de EROs e mensuração simultânea da membrana plasmática e metabolismo.

3.4.3 Mensuração das espécies reativas de oxigênio

Uma alíquota de 300 μL foi retirada do tubo do teste de longevidade (tempos 0;2 e 4h) de cada tratamento e foram adicionados 10 μL da sonda 2',7'-diacetado de diclorofluoresceína (DCFH-DA) na concentração de 1mM e 5 μL de Hoechst 33342 a 2,5mg/mL. As amostras foram incubadas por 30 minutos a 37°C protegidas da luz, em banho-maria seco. Após o tempo de incubação 6 μL da amostra foram pipetados em uma lâmina, coberta por uma lamínula e levados ao microscópio de epifluorescência (Nikon Eclipse 80i) utilizando o filtro triplo (D/F/R, C58420, em aumento de 1000x como anteriormente especificado. Foram contadas 200 células de acordo com a seguinte classificação: células verdes intensas foram consideradas com alta concentração de EROs; células em azul foram consideradas com baixa EROs. Em caso de dificuldade a coloração da célula foi confirmada no filtro para emissão de espectro verde (excitação 465-495 e emissão 515-555) especificado anteriormente no experimento 1.

3.4.4 Análise simultânea do metabolismo e membrana plasmática

Uma alíquota de 300 μL foi retirada do tubo do teste de longevidade de cada tratamento nos tempos 0,2 e 4 horas e foram adicionados 5 μL de Hoechst 33342, 3 μL de Iodeto de propídio e 6 μL de solução trabalho de resazurina (preparada conforme o fabricante). Após a incubação por 15 minutos, em local escuro em temperatura de 37°C, 6 μL foram colocados em uma lâmina e lamínula e analisadas sob microscopia de epifluorescência (Nikon Eclipse 80i)

utilizando filtro triplo anteriormente especificado (D/F/R C58420). Foram contadas 200 células e divididas em 4 categorias conforme o Quadro 1.

3.4.5 Análise computadorizada da motilidade espermática (CASA)

A análise da motilidade computadorizada foi realizada com o sêmen retirado do tubo do teste de longevidade (10 μ L) e colocados em uma câmara de Makler[®] (SEFI Medical Instruments, Israel). O sêmen pós-congelamento foi avaliado quanto às características de movimento espermático utilizando CASA (HTM-IVOS, Versão 12,3, Hamilton Thorn Research, Beverly, Massachusetts, USA). A temperatura interna do aparelho foi ajustada para 37°C e o *setup* utilizado foi o indicado para equinos pelo manual do equipamento: frames/seg. (Hz): 60; número de frames: 45; contraste mínimo: 70 pixels. Cutoff de VAP para células lentas: 20 μ m/seg (consideradas estáticas). Células progressivas: 50 μ m/seg e 75% de linearidade. As características consideradas para as análise foram: MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; VAP= velocidade do trajeto; VSL= velocidade progressiva; VCL= velocidade curvilínea; ALH= amplitude lateral de cabeça; BCF= frequência de batimento flagelar; STR: retilinearidade; LIN= linearidade; RAP= células rápidas.

3.4.6 Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o programa SAS (versão 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). As premissas de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram previamente testadas e quando necessárias foram realizadas as devidas transformações. As variáveis foram analisadas pelo PROC MIXED, utilizando modelo linear misto para medidas repetidas no tempo, sendo considerados os efeitos fixos tratamento e tempo de incubação. As variáveis que apresentaram efeito significativo foram submetidas ao PROC LSMEANS, com teste de Tukey ajustado. Foi realizada análise de correlação de Pearson entre as características de espécies reativas de oxigênio no experimento 1 e análise de regressão linear para a validação das técnicas de mensuração. O nível de significância considerado foi de 5%. Todos os dados respeitaram as premissas e então não foram utilizados testes não-paramétricos.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento1

4.1.1 Validação da técnica de mensuração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O efeito do tratamento sobre a porcentagem de células expressando EROs foi significativo ($P < 0,001$), (Figura 1). Foi encontrada correlação significativa ($P < 0,001$; $r = 0,95$) entre as duas técnicas utilizadas para quantificar as EROs (Figura 2).

Figura 1 -Regressão linear entre tratamento e porcentagem de espermatozoides expressando alta concentração de EROs mensurados pela sonda DCFH-DA

Notas: Tratamento corresponde a proporção de células induzidas com H_2O_2 para produção de EROs. 0= amostra com 300µl de sêmen fresco; 50= amostra mista 150µl sêmen fresco e 150µ com amostra induzidas; 100= 300µl de sêmen induzido.

Fonte: (CARVALHO,2013)

Figura 2 - Correlação entre porcentagem de espermatozoides considerados com alta concentração de EROs mensurados por DCFH-DA e pela técnica de associação de DCFH-DA + Hoechst 33342, em microscopia de epifluorescência

Nota: DCFDH-DA: 2',7'-diacetado de diclorofluoresceína a 1mM

Fonte: (CARVALHO,2013)

4.1.2 Análise simultânea do metabolismo e membrana plasmática.

Figura 3 - Regressão linear entre tratamento e porcentagem de células expressando redução da resazurina

Notas: Tratamento corresponde a proporção de células tratadas por flash-frozen. 0= amostra com 300µL de sêmen fresco; 50= amostra mista 150µL sêmen fresco e 150µL com amostra flash-frozen; 100= 300µL de sêmen flash-frozen. Células expressando redução da resazurina medidas por microscopia de epifluorescência.

Fonte: (CARVALHO, 2013)

4.2 Experimento 2

Ocorreu efeito de tratamento e interação tempo de incubação e tratamento com exceção da mensuração de espécies reativas de oxigênio, que ocorreu apenas efeito de tratamento ($P < 0,001$). Os resultados das características de movimento espermático analisado por CASA encontram-se na Tabela 4.

4.2.1 Mensuração das espécies reativas de oxigênio

Nas análises de EROs ocorreu diferença estatística somente no tempo 0h de incubação, sendo o grupo controle com maior porcentagem de células expressando alto EROs (Figura 4).

Figura 4 - Porcentagem de células consideradas com alta concentração de EROs nos diferentes tratamentos no tempo 0h de descongelação

Nota: Porcentagens de células expressando alto quantidade de EROs intracelular. Box-plots representam a mediana, valores mínimos, máximos e quartis ($n=25$). Letras diferentes sobre cada box-plot indicam diferença estatística. ($P < 0,05$). CON= Controle; MIO= mio-inositol; AFE= ácido ferúlico.

Fonte: (CARVALHO, 2013)

4.2.2 Análise simultânea do metabolismo e membrana plasmática.

O tratamento com mio-inositol resultou em maior número de células MIAM em todos os tempos (Figura 5). Ocorreu efeito de interação entre tempo e tratamento

Figura 5 - Porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e alto metabolismo nos diferentes tratamentos durante 3 tempos de incubação (0, 2, 4 horas)

Notas: MIAM = porcentagem de células com membrana plasmática íntegra e alto metabolismo.

Letras maiúsculas sobre as barras dentro do mesmo tempo entre os tratamentos representam diferença estatística ($P < 0,05$).

Fonte: (CARVALHO, 2013)

Tabela 2 - Médias $\pm$ erros padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra entre os tratamentos durante 3 tempos de incubação (0, 2 e 4 horas)

TEMPOS	MPI (%)		
	TRATAMENTOS		
	CON	MIO	AFE
T0	48,0 $\pm$ 1,0 ^{Ba}	53,3 $\pm$ 1,4 ^{Aa}	41,2 $\pm$ 1,5 ^{Ba}
T2	44,9 $\pm$ 1,1 ^{Ba}	50,0 $\pm$ 1,0 ^{Aa}	35,6 $\pm$ 1,5 ^{Cb}
T4	31,5 $\pm$ 1,7 ^{Bb}	37,9 $\pm$ 1,5 ^{Ab}	25,8 $\pm$ 1,7 ^{Cc}

Notas: MPI= Membrana plasmática íntegra (%); CON= Controle; MIO= Mio-inositol; AFE= ácido ferúlico
 Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Fonte: (CARVALHO, 2013)

Tabela 3 - Médias $\pm$ erros padrão da porcentagem de espermatozoides com alto metabolismo analisado pela redução da resazurina sob microscopia de epifluorescência entre os tratamentos durante 3 tempos de incubação (0, 2 e 4 horas)

TEMPOS	AMT		
	TRATAMENTOS		
	CON	MIO	AFE
T0	51,2 $\pm$ 1,3 ^{Ba}	54,2 $\pm$ 1,2 ^{Aa}	53,88 $\pm$ 1,6 ^{Aa}
T2	39,4 $\pm$ 0,9 ^{Bb}	46,0 $\pm$ 1,5 ^{Ab}	46,4 $\pm$ 1,4 ^{Ab}
T4	36,4 $\pm$ 2,6 ^{Bc}	36,6 $\pm$ 3,0 ^{Bc}	39,5 $\pm$ 2,7 ^{Ac}

Nota: AMT= alto metabolismo (%); CON= Controle; MIO= Mio-inositol; AFE= ácido ferúlico. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$). Letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

Fonte: (CARVALHO, 2013)

Tabela 4 - Médias das características do movimento espermático medidos por CASA em três tempos de incubação e diferentes tratamentos

VARIÁVEIS		TRATAMENTOS		
		CON	MIO	AFE
T0h	MT (%)	58,8± 2,9 ^A	60,1±3,5 ^A	53,1±2,6 ^B
	MP (%)	40,7±2,1 ^B	44,6±2,9 ^A	38,0±2,1 ^B
	VAP(µm/s)	98,6±4 ^A	91,4±4,1 ^A	88±2,8 ^B
	VSL (µm/s)	79±2,4 ^A	76,5±2,2 ^A	72,3±1,8 ^B
	VCL (µm/s)	178,5±5,7	172,8±6,0	163,2±3,8
	ALH (µm/s)	6,8±0,2	6,7±0,2	6,7±0,2
	BCF (Hz)	37,2±0,8	36,7±0,5	34,4±1
	STR (%)	80,68±0,7	83,2±0,5	82,7±0,6
	LIN (%)	45±0,7	46,5±0,6	45,2±0,8
	RAP (%)	50,9±3,3	54,3±3,9	47,2±2,9
VARIÁVEIS		TRATAMENTOS		
		CON	MIO	AFE
T2h	MT (%)	31,1±1,9 ^B	39,0±2,5 ^A	26,5±2,4 ^C
	MP (%)	12,4±1,2 ^B	15,5±1,8 ^A	10,1±1,3 ^B
	VAP(µm/s)	54,7±2,2	56,2±3,2	52,2±1,65
	VSL (µm/s)	43,3±2,5	47,5±3,2	42,1±1,6
	VCL (µm/s)	113,2±2,5	115,1±4,5	110,5±2,6
	ALH (µm/s)	6,1±0,1	5,7±0,2	6,0±0,1
	BCF (Hz)	32,5±0,8	32,7±1	31,0±1,0
	STR (%)	78,7±1,1	80,8±1,1	78,6±0,9
	LIN (%)	37,1±0,8	38,8±1,0	36,6±0,4
	RAP (%)	15,2±1,2 ^B	18,7±2,0 ^A	13,1±1,5 ^B
VARIÁVEIS		TRATAMENTOS		
		CON	MIO	AFE
T4h	MT (%)	14,9±2,1 ^B	17,8±1,9 ^A	11,2±1,3 ^C
	MP (%)	4,2±1,5	3,8±1,1	3,0±0,6
	VAP(µm/s)	48,0±3,5	41,15±3,0	47,4±2,2
	VSL (µm/s)	33,1±3,7	28,6±3,3	33,0±2,7
	VCL (µm/s)	105,8±4,3	100,6±4,7	101,3±3,6
	ALH (µm/s)	6,4±0,3	5,7±0,5	5,5±0,7
	BCF (Hz)	32,3±1,3	34,3±1,3	32,1±1,0
	STR (%)	72,64±1,4	70,3±2,4	71,9±2,2
	LIN (%)	31,8±1,0	30,8±1,4	31,3±1,1
	RAP (%)	5,2±1,5	5,1±1,0	3,5±0,6

Notas: Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferença estatística (P<0,05)

MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; VAP= velocidade do trajeto; VSL= velocidade progressiva; VCL= velocidade curvilínea; ALH= amplitude lateral de cabeça; BCF= frequência de batimento flagelar; STR: retilinearidade; LIN= linearidade; RAP= células rápidas

CON= controle; MIO= Mio-inositol; AFE= ácido ferúlico

Fonte (CARVALHO,2013)

5 DISCUSSÃO

Devido a soma de todos os danos causados à célula espermática durante a congelação, sua longevidade é drasticamente reduzida, diminuindo assim o tempo durante o qual ela se mantém em estado ótimo para a fertilização (BARBACINI et al., 2000). Sendo assim é de extrema importância que a vida útil dos espermatozoides seja prolongada. O mio-inositol possibilitou maior longevidade às células, visto que auxiliou na manutenção da motilidade mais elevada que no grupo controle por até 4h de incubação. Os parâmetros de motilidade foram menores que os valores encontrados por Pojprasath et al. (2011) no tempo de 4h de incubação. Provavelmente devido à uma menor temperatura que o sêmen foi incubado (25°C).

Baseado no estudo de Brinsko, Varner e Blanchard (1991), o tempo de transporte do espermatozoide até a tuba uterina provavelmente demore menos que 4 horas. O tratamento com mio-inositol resultou em maior porcentagem de células rápidas no tempo de 2h. O rápido transporte espermático é extremamente importante, uma vez que o útero é um ambiente hostil para o espermatozoide, que deve alcançar rapidamente a tuba uterina (TROEDSSON; LIU; CRABO, 1998). Entretanto, espermatozoides que passaram pelo processo de criopreservação apresentam uma reduzida habilidade em se fixarem no epitélio da tuba (DOBRINSKI; THOMAS; BALL, 1995) e um atraso em colonizar o ístimo (BADER, 1982). Desse modo o efeito protetor do mio-inositol na longevidade espermática se torna ainda mais desejado.

Provavelmente o efeito do mio-inositol na qualidade espermática tenha sido causado por ação osmorreguladora (SETYAWAN et al., 2009). Ele possivelmente contrabalanceou as mudanças bruscas de volume dos espermatozoides. Desse modo evitou, a certo ponto, os efeitos subletais do dano osmótico que é refletido na reduzida longevidade espermática. O mio-inositol já foi utilizado na criopreservação do sêmen bovino e também foi benéfico para os espermatozoides (SETYAWAN et al., 2009). Ele possivelmente contrabalanceou as mudanças bruscas de volume dos espermatozoides, desse modo evitou, a certo ponto, os efeitos subletais do dano osmótico que é refletido na reduzida longevidade espermática. O mio-inositol já foi utilizado na criopreservação do sêmen bovino e também foi benéfico para os espermatozoides (BUCAK et al., 2010). Em equinos outros reguladores osmóticos como o sorbitol (POJPRASATH et al., 2011) e a trealose (SNOECK; COTTORELLO; HENRY, 2012) foram testados na criopreservação. O sorbitol melhorou de maneira significativa a motilidade e função espermática e a trealose auxiliou na substituição do crioprotetor glicerol.

Outro efeito benéfico do mio-inositol foi a ação antioxidante. O grupo tratado com essa substância demonstrou menos quantidades de células com alta porcentagem de EROs. A quantidade de espermatozoides danificados interfere negativamente nos espermatozoides íntegros em uma amostra (PEÑA et al., 2011). Assim quanto menos células expressando altas quantidades de EROs melhor vai ser a qualidade da dose inseminante.

Pruneda et al. (2007) sugerem que o mio-inositol é permeável ao espermatozoide, atuando como osmólito e que essa classe de substâncias são encontradas no epidídimo, preparando o espermatozoide para os desafios hipotônicos dos fluidos do trato genital feminino.

O mio-inositol, pelo seu efeito osmorregulador e antioxidante pode ser útil nos processos de sexagem de espermatozoides equinos. De acordo com Morris (2005) há a necessidade de desenvolvimento de diluidores mais eficientes para a sexagem espermática por citometria de fluxo, pois os espermatozoides passam por muitos processos estressores.

Devido a maior fonte de EROs ser a mitocôndria, um antioxidante deve atuar em nível mitocondrial (BALAO DA SILVA et al., 2011). O ácido ferúlico atua não só nesse nível como é um potente eliminador de espécies reativas, além de quelar o íon ferroso (KOH, 2012; URBANIAK; SZELAG; MOLSKI, 2013). Seu efeito em diminuir as células com alta concentração de EROs foi evidenciada nesse experimento. Apesar do efeito prejudicial das EROs quando em quantidade elevada, sua presença é absolutamente necessária para as funções vitais do espermatozoide (VENKATESH et al., 2009). Provavelmente a ação antioxidante do ácido ferúlico foi muito intensa prejudicando outras funções fisiológica. O ácido ferúlico atuou negativamente na membrana plasmática pois já no tempo 0 pós-descongelção foi observado menor resultado na integridade de membrana plasmática. Entretanto ele atuou de maneira benéfica no metabolismo, provavelmente protegendo o aparato mitocondrial da ação das EROs com sua ação antioxidante.

No experimento de Tuncer et al. (2010) utilizando mio-inositol e uma forma natural do ácido ferúlico na criopreservação de sêmen de caprinos, não obtiveram melhora no sêmen analisado pelo CASA, entretanto apresentaram efeito antioxidante. Encontraram também redução do número de defeitos espermáticos, com exceção do mio-inositol. Entretanto a concentração de mio-inositol que utilizaram foi muito menor que no presente experimento (2,5; 5,0 e 10mM).

A mensuração do metabolismo espermático é muito importante, visto que os espermatozoides devem possuir vários atributos funcionais para a fertilização (KUISMA et al., 2006). A análise da associação de sondas fluorescentes se mostrou eficiente em analisar a membrana e o metabolismo espermático em conjunto. Outra avaliação indireta utilizando a

sonda fluorescente resazurina é que ela pode indicar a ação das enzimas conversoras do NADPH. Essas enzimas também apresentam função antioxidante (WILLIAMS; FORD, 2001). Portanto, resazurina pode ser utilizada também como um indicativo de capacidade antioxidante da célula. Esse é o primeiro relato demonstrando que o mio-inositol pode auxiliar na criopreservação de espermatozoide equino.

6 CONCLUSÕES

O mio-inositol utilizado no diluidor de criopreservação foi útil em melhorar a qualidade espermática, principalmente em manter a motilidade, integridade de membrana e metabolismo espermático por 4h de incubação *in vitro*. O ácido ferúlico na concentração utilizada afeta negativamente a membrana plasmática e a motilidade espermática pós-descongelação, entretanto demonstrou-se eficaz em aumentar o metabolismo mensurado pelo teste da redução da resazurina sob microscopia de epifluorescência. Dessa forma recomenda-se a utilização do mio-inositol na criopreservação de espermatozoides equinos.

REFERÊNCIAS

- ALHAIDER, A. K.; WATSON, P. F. Cryopreservation of dog semen: the effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. **Animal Reproduction Science**, v. 110, n. 1-2, p. 147–161, 2009.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 105–13, 2005.
- ALVARENGA, M. A.; LEÃO, K. M. Hysteroscopic insemination of mares with low number of frozen thawed spermatozoa selected by percoll gradient. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 651–653, 2002.
- ALVARENGA, M. A.; LEÃO, K. M.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L.; GOMES, G. M. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: WORKSHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, HAVEMEYER FOUNDATION, 2003, Brewster, Massachusetts. **Proceedings...** Reino Unido: R & W Publications, 2004. p. 74–76, 2003.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage do human sperm during cryopreservation. **Journal Andrology**, v. 13, n. 3, p. 232–241, 1992.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. **Journal Andrology**, v. 14, n. 3, p. 199-209, 1993.
- AMANN, R.; PICKETT, B. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145–173, 1987.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- BADER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 32, p. 59–64, 1982.
- BALAO DA SILVA, C. M.; MACÍAS-GARCÍA, B.; MIRÓ-MORÁN, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORILLO-RODRIGUEZ, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; STILWELL, G.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v. 51, n. 2, p. 172–179, 2011.
- BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 1061–1069, 2001.

BALL, B. A. Hysteroscopic and low-dose insemination techniques in the horse. In: BALL, B. A. Recent advances in equine reproduction. Ithaca: IVIS, 2004. p. [1-8].

BARBACINI, S.; ZAVAGLIA, G.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; NECCHI, D. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. **Equine Veterinary Education**, v. 12, n. 6, p. 312–317, 2000.

BARKER, C. A.; GANDIER, J. C. Pregnancy in mare resultin from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v. 21, n. 2, p. 47–51, 1957.

BATCHELOR, R. H.; ZHOU, M. Use of cellular glucose-6-phosphate dehydrogenase for cell quantitation: applications in cytotoxicity and apoptosis assays. **Analytical Biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 35–42, 2004.

BLANCO, J. M.; LONG, J. A; GEE, G.; DONOGHUE, A. M.; WILDT, D. E. Osmotic tolerance of avian spermatozoa: influence of time, temperature, cryoprotectant and membrane ion pump function on sperm viability. **Cryobiology**, v. 56, n. 1, p. 8–14, 2008.

BRADFORD, L. L.; BUHR, M. M. Function of cryopreserved horse semen is improved by optimized thawing rates. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 22, n. 12, p. 546–550, 2002.

BRINSKO, S. P. Insemination doses : how low can we go ? **Theriogenology**, v. 66, p. 543–550, 2006.

BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BAUER, J. E.; MACPHERSON, M. L.; VARNER, D. D. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1-2, p. 65–71, 2007.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D. Artificial insemination and preservation of semen. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 205–218, 1992.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. The effect of uterine lavage performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares. **Theriogenology**, v. 35, n. 6, p. 1111–1119, 1991.

BUCAK, M, N.; TUNCER, P.B.; SARIOZKAN, S.; BASPINAR, N.; TASPINAR, M.; ÇOYAN, K.; BILGILI, A.; AKALIN, P. P.; BUYUKLEBLEBICI, S.; AYDOS, S.; ILGAZ, S.; SUNGUROGLU, A.; OZTUNA, D. Cryobiology Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters : Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, p. 248–253, 2010.

BUCHANAN, B.; SEIDEL, G.; MCCUE, P.; SCHENK, J. L.; HERICKHOFF, L. A.; SQUIRES, E. L. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1333–1344, 1999.

BURNS, P. J. Modification of Kenney's extender for cryopreservation of equine spermatozoa. **INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION**, 12., 1992, Netherlands. **Proceedings...** 1992. p.1849–1851.

BURNS, P. J.; REASNER, D. S. Computerized analysis of sperm motion: Effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 15, n. 9, p. 377–380, 1995.

CARLOMAGNO, G.; NORDIO, M.; CHIU, T. T.; UNFER, V. Contribution of myo-inositol and melatonin to human reproduction. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 159, n. 2, p. 267–72, 2011.

CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, L. J.; COUTINHO DA SILVA, M. A.; CHECURA, C. M.; SCOQQIN, C. F.; SQUIRES, E. L. Equine sperm-oocyte interaction: results after intraoviductal and intrauterine inseminations of recipients for oocyte transfer. **Animal reproduction science**, v. 68, n. 3-4, p. 305–14, 2001.

CARTER, R. A.; ERICSSON, S. A.; CORN, C. D.; WEYERTS, P. R.; DART, M. G.; ESCUE, S. G.; MESTA, J. Assessing the fertility potential of equine semen samples using the reducible dyes methylene green and resazurin. **Archives of Andrology**, v. 40, n. 1, p. 59–66, 1998.

CELEGHINI, E. C. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479–88, 2007.

CHAKRABARTY, J.; BANERJEE, D.; PAL, D.; DE, J.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G. C. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 54, n. 1, p. 27–35, 2007.

CHEN, Q.; PENG, H.; LEI, L.; ZHANG, Y.; KUANG, H.; CAO, Y.; SHI, Q. X.; MA, T.; DUAN, E. Aquaporin3 is a sperm water channel essential for postcopulatory sperm osmoadaptation and migration. **Cell Research**, v. 21, n. 6, p. 922–933, 2011.

CHENG, F. P.; WU, J. T.; CHAN, J. P.; WANG, J. S.; FUNG, H. P.; COLENBRANDER, B.; TUNG, K. C. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. **Theriogenology**, v. 61, n. 9, p. 1605–16, 2004.

CHOTIMARKORN, C.; USHIO, H. The effect of trans-ferulic acid and gamma-oryzanol on ethanol-induced liver injury in C57BL mouse. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 15, n. 11, p. 951–8, 2008.

CLULOW, J. R.; MANSFIELD, L. J.; MORRIS, L. H. A; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 3-4, p. 298–308, 2008.

CONDORELLI, R. A.; LA VIGNERA, S.; BELLANCA, S.; VICARI, E.; CALOGERO, A. E. Myoinositol: does it improve sperm mitochondrial function and sperm, motility? **Urology**, v. 79, n. 6, p. 1290-1295, 2012

CORREA, L. M.; THOMAS, A.; MEYERS, S. A. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 6, p. 942–53, 2007.

COUTINHO DA SILVA, M. A.; CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, L. J.; PREIS, K. A.; SEIDEL JR., G. E.; SQUIRES, E. L. Oocyte transfer in mares with intrauterine or intraoviductal insemination using fresh, cooled, and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v. 61, n. 4, p. 705–13, 2004.

CRISTANELLI, M.; SQUIRES, E.; AMANN, R.; PICKETT, B. Fertility of Stallion Semen Processed, Frozen and Thawed by a New Procedure. **Processing**, v. 22, n. 1, p. 39–45, 1984.

CROWE, C. A. M.; RAVENHILL, P. J.; HEPBURN, R. J.; SHEPHERD, C. H. A retrospective study of artificial insemination of 251 mares using chilled and fixed time frozen-thawed semen. **Equine Veterinary Journal**, v. 40, p. 572–576, 2008.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v. 14, n. 4, p. 466–70, 1977.

DOBRINSKI, I.; THOMAS, P. G. A.; BALL, B. A. Cryopreservation Reduces the Ability of Equine Spermatozoa to Attach to Oviductal Epithelial Cells and Zonae Pellucidae. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 536–542, 1995.

FAYRERHOSKEN, R.; ABREUBARBOSA, C.; HEUSNER, G.; JONES, L. Cryopreservation of stallion spermatozoa with inra96 and glycerol. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, p. 672–676, 2008.

FOOTE, R. H. The history of artificial insemination : Selected notes and notables The online version of this article , along with updated information and services. **Journal Animal Science**, v. 80, p. 1–10, 2002. Supplement, 2.

FORD, W. C. L.; REES, J. M. The bioenergetics of mammalian sperm motility. In: GAGNON, C. (Ed.). **Controls of sperm motility: biological and clinical aspects**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p. 175–202.

GARCÍA, B. M.; MORAN, A. M.; FERNÁNDEZ, L. G.; FERRUSOLA, C. O.; RODRIGUEZ, A. M.; BOLAÑOS, J. M.; DA SILVA, C. M.; MARTINEZ, H. R.; TAPIA, J. A.; PENÁ, F. J. The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic-induced stress: role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, p. 105–13, 2012.

GIBB, Z.; BUTLER, T. J.; MORRIS, L. H. A; MAXWELL, W. M. C.; GRUPEN, C. G. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 1001–9, 2013.

GIORDANO, D.; CORRADO, F.; SANTAMARIA, A.; QUATTRONE, S.; PINTAUDI, B.; DI BENEDETTO, A.; D'ANNA, R. Effects of myo-inositol supplementation in postmenopausal women with metabolic syndrome: a perspective, randomized, placebo-controlled study. **Menopause**, v.18, p.102-104, 2011.

GERLI, S.; MIGNOSA, M.; DI RENZO, G. C. Effects of inositol on ovarian function and metabolic factors in women with PCOS: a randomized double blind placebo-controlled trial. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 7, n.6, p. 151–159, 2003.

GLASS, R. H.; ERICSSON, S. A.; ERICSSON, R. J.; DROUIN, M. T.; MARCOUX, L. J.; SULLIVAN, H. The resazurin reduction test provides an assessment of sperm activity. **Fertility and Sterility**, v. 56, n. 4, p. 743–6, 1991.

GLAZAR, A. I.; MULLEN, S. F.; LIU, J.; BENSON, J. D.; CRITSER, J. K.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, v. 59, n. 2, p. 201–6, 2009.

GLIOZZI, T. M.; LUZI, F.; CEROLINI, S. Assessment of sperm viability in boar, rabbit and rooster: a modification of the fluorometric ethidium bromide exclusion procedure. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 635–645, 2003.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORRELL, J. M.; PEÑA, F. J.; MACÍAS-GARCÍA, B. Osmotic shock induces structural damage on equine spermatozoa plasmalemma and mitochondria. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 415–22, 2012.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 131–147, 1996.

GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, n. 1, p. 42–52, 1987.

GUTIÉRREZ-PÉREZ, O.; JUÁREZ-MOSQUEDA, M. L.; MOTA, D.; TRUJILLO, M. E. The disruption in actin-perinuclear theca interactions are related with changes induced by cryopreservation observed on sperm chromatin nuclear decondensation of boar semen. **Cryobiology**, v. 62, n. 1, p. 32–39, 2011.

HE, L. Incorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 69–79, 2001.

HOFFMANN, N.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified “good” or “poor” for freezing. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1-4, p. 112–8, 2011.

HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, p. 683–700, 1999.

ISHIBASHI, K.; KUWAHARA, M.; GU, Y.; KAGEYAMA, Y.; TOHSAKA, A.; SUZUKI, F.; MARUMO, F.; SASAKI, S. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 33, p. 20782–20786, 1997.

KARESKOSKI, A. M.; REILAS, T.; SANKARI, S.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Composition of fractionated stallion ejaculates. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 228–230, 2005.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 249–56, 2008.

KOH, P.-O. Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decrease of Akt and Bad phosphorylation. **Neuroscience Letters**, v. 507, n. 2, p. 156–60, 2012a.

KOPPERS, A. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; MCLAUGHLIN, E. A.; AITKEN, R. J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3199–207, 2008.

KUISMA, P.; ANDERSSON, M.; KOSKINEN, E.; KATILA, T. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, p. 14, 2006.

LANZAFAME, F. M.; LA VIGNERA, S.; VICARI, E.; CALOGERO, A. E. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 19, n. 5, p. 638-659, 2009.

LEOPOLD, S.; SAMPER, J. C.; CURTIS, E.; BUHR, M. M. Effect of cryopreservation and oviductal cell conditioned media on Ca²⁺ flux of equine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, , n. 56, p. 431–445, 2000.

LINDSEY, A. C.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 279–89, 2001.

LINDSEY, A. C.; MORRIS, L. H. A.; ALLEN, W. R.; SCHENK, J. L.; SQUIRES, E. L.; BRUEMMER, J. E. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of nonsorted or flow sorted spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 2, p. 128–132, 2002.

LOGUE, J. A.; VIGH, L.; JOÓ, F.; COSSINS, A. R. Catalytic hydrogenation of polyunsaturated biological membranes: effects on membrane fatty acid composition and physical properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1368, n. 1, p. 41–51, 1998.

LOOMIS, P. R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 191–200, 2001.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 22, n. 3, p. 663–676, 2006.

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1-2, p. 119–28, 2008.

LOOMIS, P. R.; SQUIRES, E. L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 480–91, 2005.

LOWTHER, K. M.; WEITZMAN, V. N.; MAIER, D.; MEHLMANN, L. M. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. **Biol Reprod**, v.81, n. 1, p. 147–154, 2009.

MAGISTRINI, M.; VIDAMENT, M.; CLEMENT, F.; PALMER, E. Fertility prediction in stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 181–188, 1996.

MAGNANI, E.; BETTINI, E. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect. **Brain Research. Brain Research Protocols**, v. 5, n. 3, p. 266–72, 2000.

MAHMOUD, A. M.; COMHAIRE, F. H.; VERMEULEN, L.; ANDREOU, E. Comparison of the resazurin test, adenosine triphosphate in semen, and various sperm parameters. **Human Reproduction**, v. 9, n. 9, p. 1688–93, 1994.

MANN, T. **The Biochemistry of semen and of the male reproductive tract**. New York: John Wiley and Sons, 1964.

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

MATTNER, B. P. E.; ENTWISTLE, K. W.; MARTINT, I. C. A. Passage, survival, and fertility of deep-frozen ram semen in the genital tract of the ewe. **Australian Journal Biological Science**, v. 22, n. 1, p. 181–187, 1969.

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; SEIDEL, G. E. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. **Biology of Reproduction**, v. 78, n. 1, p. 2–12, 2008.

MENNICK, P. E. Equine semen cryopreservation: an update. In: SOCIETY THERIOGENOLOGY PROCEEDINGS ANNUAL MEETING, 1997, Montreal, Quebec, **Proceedings...** 1997. p. 161–169.

MEYERS, S. A. Spermatozoal response to osmotic stress. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 57–64, 2005.

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

MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v. 51, n. 3, p. 241–9, 2005.

MOORE, C. M.; BREEZE, J. L.; KUKES, T. J.; et al. Effects of myo-inositol ingestion on human brain myo-inositol levels: a proton magnetic resonance spectroscopic imaging study. **Biological psychiatry**, v. 45, n. 9, p. 1197–202, 1999.

MORILLO RODRIGUEZ, A; BALAO DA SILVA, C.; MACÍAS-GARCÍA, B.; GALLARDO BOLAÑOS, J. M.; TAPIA, J. A.; APARICIO, I. M.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; PEÑA, F. J. Dimethylformamide improves the in vitro characteristics of thawed stallion spermatozoa reducing sublethal damage. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p. 995–1002, 2012.

MORIMURA, H.; SHIMADA, S.; OTORI, Y.; et al. Expression of Na⁺/myo-inositol cotransporter mRNA in normal and hypertonic stress rat eyes. **Molecular Brain Research**, v. 35, n. 1-2, p. 333–338, 1996.

MORRIS, G. J.; FASZER, K.; GREEN, J. E.; DRAPER, D.; GROUT, B. W.; FONSECA, F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 804–12, 2007.

MORRIS, L. Advanced insemination techniques in mares. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 22, n. 3, p. 693–703, 2006.

MORRIS, L. H. A. Challenges facing sex preselection of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 147–157, 2005.

MORRIS, L. H. A.; ALLEN, W. R. An Overview of low dose insemination in the mare hysteroscopic insemination. **Reproduction Domestic Animals**, v. 210, p. 206–210, 2002.

MORRIS, L. H. A.; TIPLADY, C.; ALLEN, W. R. Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, n. 2, p. 197–201, 2003.

MOUSSA, M.; MARINET, V.; TRIMECHE, A; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1695–706, 2002.

MUIÑO, R.; RIVERA, M. M.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; PEÑA, A I. Effect of different thawing rates on post-thaw sperm viability, kinematic parameters and motile sperm subpopulations structure of bull semen. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1-4, p. 50–64, 2008.

NEILD, D. N.; GADELLA, B. M.; AGÜERO, A; STOUT, T. A E.; COLENBRANDER, B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 47–56, 2005.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OEHNINGER, S.; DURU, N. K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, n. 1-2, p. 3–10, 2000.

OLDENHOF, H.; BLÄSSE, A.-K.; WOLKERS, W. F.; BOLLWEIN, H.; SIEME, H. Osmotic properties of stallion sperm subpopulations determined by simultaneous assessment of cell volume and viability. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 386–391, 2011.

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

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MORRELL, J. M.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, n. 1, p. 55–63, 2009.

PACE, M. M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 6, p. 1144–1149, 1974.

PAMORNSAKDA, T.; POJPRASATH, T.; SUWIMONTEERABUTR, J.; THARASANIT, T. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm. **Cryobiology**, v. 63, n. 2, p. 90–95, 2011.

PAPA, F. O.; FELÍCIO, G. B.; MELO-OÑA, C. M.; ALVARENGA, M. A.; DE VITA, B. de.; TRINQUE, C.; PUOLI-FILHO, J. N. P.; DELL AQUA JR., J. A. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 1-2, p. 73–77, 2011.

PARKS, E.; LYNCH, D. V. Lipid Composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255–266, 1992.
PEÑA, F. J.; GARCÍA, B. M.; SAMPER, J. C.; APARICIO, I. M.; TAPIA, J. A.; FERRUSOLA, C. O. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1177–1186, 2011.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v. 37, n. 7, p. 597–612, 2006.

PETERSEN, M. M.; WESSEL, M. T.; SCOTT, M. A. Embryo recovery rates in mares after deep intrauterine insemination with low numbers of cryopreserved equine spermatozoa. **Veterinary Reproduction & Obstetrics**, v. 58, n. 3, p. 663–665, 2002.

PICHARDO, A. I.; ARAGÓN-MARTÍNEZ, A.; AYALA-ESCOBAR, M. E.; DOMÍNGUEZ-VARA, I. A. Viability tests, active caspase-3 and -7, and chromatin structure in ram sperm selected using the swim-up procedure. **Journal of Andrology**, v. 31, n. 2, p. 169–176, 2010.

PICKETT, B. W.; VOSS, J. L.; SQUIRES, E. L. **Collection, preparation and insemination of stallion semen**. Fort Collins, CO: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, 2000. (Bulletin number 10).

PILLET, E.; DUCHAMP, G.; BATELLIER, F.; BEAUMAL, V.; ANTON, M.; DESHERCES, S.; SCHMITT, E.; MAGISTRINI, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 105–114, 2011.

PILLET, E.; LABBE, C.; BATELLIER, F.; DUCHAMP, G.; BEAUMAL, V.; ANTON, M.; DESHERCES, S.; SCHMITT, E.; MAGISTRINI, M. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 268–279, 2012.

POJPRASATH, T.; LOHACHIT, C.; TECHAKUMPHU, M.; STOUT, T.; THARASANIT, T. Improved cryopreservability of stallion sperm using a sorbitol-based freezing extender. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1742–1749, 2011.

POMMER, A. C.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S. A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. **Theriogenology**, v. 58, n. 7, p. 1373–1384, 2002.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, v. 46, p. 541–549, 1973.

PRUNEDA, A.; YEUNG, C.-H.; BONET, S.; PINART, E.; COOPER, T. G. Concentrations of carnitine, glutamate and myo-inositol in epididymal fluid and spermatozoa from boars. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 3-4, p. 344–55, 2007.

PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, v. 48, n. 1, p. 36–45, 2004.

RASTOGI, R. P.; SINGH, S. P.; HÄDER, D.-P.; SINHA, R. P. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 397, n. 3, p. 603–607, 2010.

REGER, H. .; BRUEMMER, J. .; SQUIRES, E. L.; MACLELLAN, L. J.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; ZAVAGLIA, G. Effects of timing and placement of cryopreserved semen on fertility of mares. **Equine Veterinary Education**, v. 15, p. 101–106, 2003.

RICKER, J. V.; LINFOR, J. J.; DELFINO, W. J.; KYSAR, P.; SCHOLTZ, E. L.; TABLIN, F.; CROWE, J. H.; BALL, B. A.; MEYERS, S. A. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 2, p. 359–365, 2006.

RODRÍGUEZ, A. M.; FERRUSOLA, C. O.; GARCÍA, B. M.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Effect of BAPTA-AM on thawed stallion spermatozoa extended in INRA 96 or tyrode's medium. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 8, p. 622–627, 2013.

RODRÍGUEZ, M.; FERRUSOLA, C. O.; GARCÍA, B. M.; MARTINEZ, H. R.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Freezing stallion semen with the new Cáceres extender improves post thaw sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 1-2, p. 78–83, 2011.

SAMPER, J. C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 219–28, 2001.

SAMPER, J. C.; HELLANDER, J. C.; CRABO, B. G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 44, p. 107–114, 1991.

SAMPER, J. C.; MORRIS, A. Current Methods for stallion semen cryopreservation: A survey. **Theriogenology**, v. 49, p. 895–903, 1998.

SETYAWAN, E. E. M.; COOPER, T. G.; WIDIASIH, D. A.; JUNAIDI, A.; YEUNG, C.-H. Effects of cryoprotectant treatments on bovine sperm function and osmolyte content. **Asian journal of Andrology**, v. 11, n. 5, p. 571–581, 2009.

SHANNON, P.; CURSON, B. Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 5, p. 614–620, 1972.

SHANTHAKUMAR, J.; KARTHIKEYAN, A.; BANDUGULA, V. R.; RAJENDRA PRASAD, N. Ferulic acid, a dietary phenolic acid, modulates radiation effects in Swiss albino mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, n. 1-3, p. 268–274, 2012.

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, n. 3-4, p. 276–92, 2008.

SIEME, H.; SCHÄFER, T.; STOUT, T. A. .; KLUG, E.; WABERSKI, D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1153–1164, 2003.

SNOECK, P. P. N.; COTTORELLO, A. C. P.; HENRY, M. Viability and fertility of stallion semen frozen with ethylene glycol and acetamide as a cryogenic agent. **Animal Reproduction**, v. 55, n. 73, p. 3–9, 2012.

SQUIRES, E. .; BARBACINI, S.; MATTHEWS, P.; BYERS, W.; SCHWENZER, K.; STEINER, J.; LOOMIS, P. Retrospective study of factors affecting fertility of fresh, cooled and frozen semen. **Equine Veterinary Education**, v. 18, p. 96–99, 2006.

SQUIRES, E. L.; KEITH, S. L.; GRAHAM, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1056–1065, 2004.

SUNG, J.-H.; KIM, M.-O.; KOH, P.-O. Ferulic acid attenuates the focal cerebral ischemic injury-induced decrease in parvalbumin expression. **Neuroscience Letters**, v. 516, n. 1, p. 146–150, 2012.

TROEDSSON, M. H.; LIU, I. K.; CRABO, B. G. Sperm transport and survival in the mare. **Theriogenology**, v. 50, n. 5, p. 807-818, 1998.

TROKEY, D. E.; MERILAN, C. P. Effect of added cold shocked cells upon the viability of pony stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 18, n. 6, p. 723–725, 1982.

TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N.; SARIÖZKAN, S.; SAKIN, F.; YENI, D.; CİĞERCI, I. H.; ATEŞŞAHİN, A.; AVDATEK, F.; GÜNDOĞAN, M.; BÜYÜKLEBLEBICI, O. The effect of raffinose and methionine on frozen/thawed Angora buck (*Capra hircus ancyrensis*) semen quality, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities. **Cryobiology**, v. 61, n. 1, p. 89–93, 2010.

URBANIĄK, A.; SZELĄG, M.; MOLSKI, M. Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1012, p. 33–40, 2013.

VALLURU, R.; VAN DEN ENDE, W. Myo-inositol and beyond--emerging networks under stress. **Plant Science : an International Journal of Experimental Plant Biology**, v. 181, n. 4, p. 387–400, 2011.

VENKATESH, S.; DEECARAMAN, M.; KUMAR, R.; SHAMSI, M. B.; DADA, R. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 129, n. 2, p. 127–137, 2009.

VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 115–136, 2005.

VIDAMENT, M.; DUPERE, A.; JULIENNE, P.; EVAİN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen, freezability: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 907–917, 1997.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 907–919, 2000.

VOLKMANN, D. H.; VAN ZYL, D. Fertility of stallion semen frozen in 0.5-ml straws. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 35, p. 143–148, 1987.

WANG, S.; HOLYOAK, G.; PANTER, K.; LUI, Y.; EVANS, R. C.; BUNCH, T. D. Resazurin reduction assay for ram sperm metabolic activity measured by spectrophotometry. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 217, n. 2, p. 197–202, 1998.

WASSALL, S. R.; STILLWELL, W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1788, n. 1, p. 24–32, 2009.

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, n. 4, 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.

WILLIAMS, A. C.; FORD, W. C. The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. **Journal of andrology**, v. 22, n. 4, p. 680–695, 2001.

WILLOUGHBY, C.E.; MAZUR, P.; PETER, A.T.; CRITSER, J.K. Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. **Biol. Reprod**, v. 55, p.715–727. 1996

YAMAGUCHI, S.; FUNAHASHI, H.; MURAKAMI, T. Improved fertility in gilts and sows after artificial insemination of frozen-thawed boar semen by supplementation of semen extender with caffeine and CaCl₂. **Journal Reproduction Development**, v. 55, n. 6, p. 645–649, 2009.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 349–355, 2000.

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

ZHENG, R.-L.; ZHANG, H. Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility , viability , lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n. 4, p. 581–586, 1997.

ZENI, A. L. B.; ZOMKOWSKI, A. D. E.; MARASCHIN, M.; RODRIGUES, A. L. S.; TASCA, C. I. Ferulic acid exerts antidepressant-like effect in the tail suspension test in mice: evidence for the involvement of the serotonergic system. **European journal of pharmacology**, v. 679, n. 1-3, p. 68–74, 2012.

ZRIMSEK, P.; KUNC, J.; KOSEC, M.; MRKUN, J. Spectrophotometric application of resazurin reduction assay to evaluate boar semen quality. **International Journal of Andrology**, v. 27, n. 1, p. 57–62, 2004.