

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**QUALIDADE DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO COM L-
ACETIL-CISTEINA**

Arthur Francisco Júnior
Orientador: Maria Lúcia Gambarini Meirinhos

GOIÂNIA
2014



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Arthur Francisco Júnior** E-mail: **arthurjr17@hotmail.com**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? Sim Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento:

País: UF: CNPJ: Sigla:

Título: **Qualidade do sêmen equino criopreservado com L-acetil-cisteína** Palavras-chave: **espermatozóides, integridade de membrana, Mangalarga Marchador, motilidade**

Título em outra língua: **Quality equine semen cryopreserved with L-acetil-cisteína**

Palavras-chave em outra língua: **Mangalarga Marchador, membrane integrity, motility, sperm**

Área de concentração: **produção animal** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **27/08/2014**

Programa de Pós-Graduação:

Orientador(a): **Profª Drª Maria Lúcia Gambarini Meirinhos** E-mail: **mlgambarini@hotmail.com**

Co-orientador(1): **Prof. Dr. Marco Antônio Viu** E-mail:

Co-orientador(2): **Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira** E-mail:

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

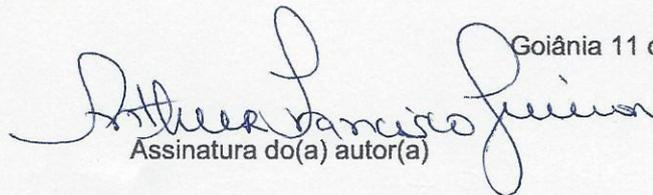
[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 11 de novembro de 2014


Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

ARTHUR FRANCISCO JÚNIOR

**QUALIDADE DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO COM L-
ACETIL-CISTEINA**

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre
em Ciência Animal junto à
Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:
Produção Animal

Orientador:

Prof^a Dr^a. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos - Universidade Federal de Goiás

Comitê de Orientação

Prof. Dr. Marco Antônio Viu - Universidade Federal de Goiás/Jataí

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira - Universidade Federal de Brasília

GOIÂNIA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)

Francisco Junior, Arthur.

Qualidade do sêmen equino criopreservado com L-acetil-cisteína [manuscrito] / Arthur Francisco Junior. - 2014.

34 f.: il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Gambarini Meirinhos; Co-orientadores: Prof. Dr Marco Antônio Viu; Prof. Dr Rodrigo Arruda de Oliveira

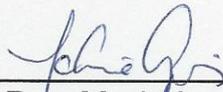
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2014.

Bibliografia.

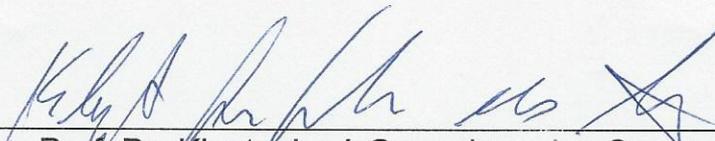
Inclui lista de abreviaturas, siglas e tabelas.

ARTHUR FRANCISCO JUNIOR

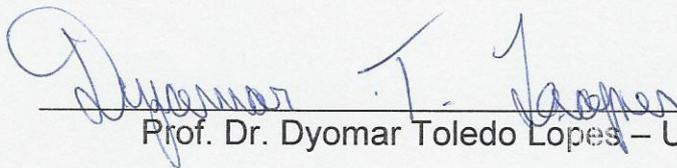
Dissertação defendida e aprovada em **27/08/2014**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dra. Maria Lucia Gambarini Meirinhos
(ORIENTADOR)



Prof. Dr. Klayto José Gonçalves dos Santos - UEG



Prof. Dr. Dyomar Toledo Lopes – UFG/Jataí

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder saúde para realização deste trabalho.

À UFG pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos professores da pós-graduação que tiveram sempre muita paciência e carinho em ensinar.

Aos colegas de pós-graduação pelos momentos de descontração e de ajuda mútua quando necessária.

Aos meus familiares que sempre demonstraram apoio, principalmente aos meus pais Arthur e Heloiza por me apoiarem e acreditarem na minha capacidade, pelos exemplos que me deram e por sempre me mostrarem o caminho correto a seguir.

Aos meus filhos e melhores amigos André e Fernanda companheiros de todos os momentos, que mesmo não estando presentes são as principais pessoas ao meu lado.

À minha orientadora Prof^a Dr^a. Maria Lúcia Gambarini por ter aceitado minha orientação, pela amizade, pelos valiosos ensinamentos e por ter tido sempre paciência nos meus momentos de falta de atenção.

Ao Prof.Dr.Benedito Dias de Oliveira Filho pela amizade, confiança e grande exemplo de competência e dedicação.

Ao meu co-orientador Prof.Dr.Rodrigo Arruda de Oliveira pela amizade de longa data e apoio na execução deste projeto em comum.

Aos cavalos que sempre fizeram parte da minha vida e a razão por eu estar fazendo este curso hoje.

Ao Dr. Carlos Frederico Martins/ Embrapa CTZL e Dr^aMargot Alves/ Cenargen/DF pela receptividade. E a Carolina Gonzales/Embrapa CTZL e José Carvalho/ Cenargen/DF pela disposição em ajudar e partilhar seus conhecimentos.

Ao médico veterinário Francisco Oliveira/Central Estábulo pela boa vontade em autorizar o congelamento de sêmen dos cavalos.

Aos irmãos escolhidos e colegas de docência Alberto França Filho, Erika Mundim e Stiwens T. Orpinelli pela amizade e por sempre estarem ao meu lado.

À minha namorada Liliane Paixão, a“Lili”, por fazer parte da minha vida, sempre me apoiando com muito carinho e com muita paciência principalmente no término do mestrado.

As amigas médicas veterinárias Ivana Borges e Carla Moraes pela atenção, apoio e disposição em ajudar.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IX
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 ESTRUTURA DA CÉLULA ESPERMÁTICA	3
2.2 ANÁLISES DO SÊMEN	4
2.3 CRIOPRESERVAÇÃO	6
2.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	10
2.5 ANTIOXIDANTES	12
2.6 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	16
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO E ANIMAIS UTILIZADOS	19
4.2. ADIÇÃO DO ANTIOXIDANTE E CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN	19
4.3. ANÁLISES LABORATORIAIS DO SÊMEN.....	20
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CINÉTICA ESPERMÁTICA PÓS DESCONGELAÇÃO DE SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO EM MEIO CONTENDO CISTEÍNA.....	3
TABELA 2 - RESULTADOS DAS ANÁLISES PÓS-DESCONGELAMENTO REFERENTES A INTEGRIDADE DE MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL.....	4

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALH	Amplitude lateral de cabeça
BCF	Frequência de batimentos
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analysis</i>
CFDA	Diacetato de 6-carboxifluoresceína
CIS	L-Acetil-cisteína
DNA	Ácido desoxirribunocléico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
GSH	Forma reduzida da glutationa
GSSG	Forma oxidada da glutationa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IA	Inseminação artificial
ICRA	Espermatozóide íntegro com reação acrossomal
IP	Iodeto de propídeo
ISRA	Espermatozóide íntegro sem reação acrossomal
LCRA.....	Lesado com reação acrossomal
LSRA	Lesado sem reação acrossomal
LIN	Linearidade
MDA	Malondialdeído
mM	milimol
μL	Microlitros
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
Se	Selênio
SOD	Superóxido dismutase
SRAT	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
STR	Retilinearidade
VAP	Velocidade de trajeto
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade retilínea

RESUMO

Esse estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da adição de L-acetil-cisteína (CIS) como agente anti oxidante ao meio diluente utilizado para criopreservação de espermatozóides de equinos da raça Mangalarga Marchador. Três amostras seminais de sete garanhões hígidos foram obtidas por meio de vagina artificial, diluídas em meio comercial e distribuídas em dois tratamentos: controle, sem adição e CIS, contendo o antioxidante na concentração de 2,5 mM. Após o período de estabilização as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e submetidas ao protocolo de criopreservação manual. Sessenta dias após as amostras foram descongeladas e avaliadas *in vitro* por meio da análise computadorizada da cinética espermática (CASA) e da avaliação da integridade das membranas plasmática e acrosomal por meio de sondas fluorescentes. Em relação às variáveis relacionadas à cinética espermática verificou-se que nas amostras suplementadas com CIS o percentual de motilidade total (MT) e progressiva (MP) foi superior ($P < 0,01$) em relação às amostras controle ($23,95 \pm 3,33$ X $11,38 \pm 2,35$ e $4,66 \pm 0,84$ X $2,04 \pm 0,36$, respectivamente), mas para as variáveis retilinearidade (STR) e linearidade (LIN) os percentuais foram maiores ($P \leq 0,01$) para as amostras Controle ($86,95 \pm 1,02$ X $82,28 \pm 1,02$ e $49,85 \pm 1,32$ X $45,19 \pm 1,17$, respectivamente). Quanto às variáveis relacionadas à integridade das membranas do espermatozóide houve superioridade ($P < 0,05$) no número de espermatozóides íntegros com reação acrossomal (ICRA) nas amostras CIS em relação àquelas controle ($4,7 \pm 1,6$ X $0,8 \pm 0,2$, respectivamente). Os resultados sugerem que a adição de L-acetil-cisteína na concentração de 2,5 mM ao meio diluente antes da criopreservação pode melhorar tanto a motilidade quanto a integridade da membrana plasmática de espermatozóides de equinos da raça Mangalarga Marchador. Mais estudos devem ser feitos para comprovar esse efeito *in vivo*.

Palavras-chave: espermatozóides, integridade de membranas, Mangalarga Marchador, motilidade

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effect of adding L-acetyl-cysteine (CIS) as anti oxidant agent to extender used for sperm cryopreservation of equine Mangalarga Marchador. Three semen samples from seven healthy stallions were obtained by artificial vagina, diluted in commercial extender and distributed into two treatments: control without addition and CIS, containing the antioxidant concentration of 2.5 mM. After the stabilization period, the samples were filled into 0.5 mL straws and subjected to cryopreservation protocol manually. Sixty days after the samples were thawed and evaluated in vitro by means of computerized analysis of sperm kinetics (CASA) and the evaluation of the integrity of plasma and acrosomal membranes by fluorescent probes. Regarding the kinetic variables related to sperm was found that in samples supplemented with CIS percentage of total and progressive motility (TM) (MP) was higher ($P < 0.01$) compared to control samples (23.95 ± 3 , $33 \times 11.38 \pm 2.35$ and $4.66 \pm 0.84 \times 2.04 \pm 0.36$, respectively), but variable for straightness (STR) and linearity (LIN) the percentages were higher ($p \leq 0.01$) for the control samples ($86.95 \pm 1.02 \times 82.28 \pm 1.02$ and $49.85 \pm 1.32 \times 45.19 \pm 1.17$, respectively). As those related to the integrity of the membranes of the sperm variables was superior ($P < 0.05$) in the number of sperm with intact acrosome reaction (ICRA) in the samples compared to those CIS Control ($4.7 \pm 1.6 \times 0.8 \pm 0.2$, respectively). The results suggest that the addition of acetyl-L-cysteine concentration of 2.5 mM in the diluent medium before cryopreservation can improve both the motility as the integrity of the sperm plasma membrane equine Mangalarga Marcher. More studies should be done to confirm this effect in vivo.

Keywords: Mangalarga Marchador, membrane integrity, motility, sperm

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia da inseminação artificial viabilizou um enorme ganho genético nas espécies em que a mesma é utilizada.

Nos equinos a IA é realizada rotineiramente e aceita pela maioria das associações de criadores. No Brasil, a técnica, apesar de ser conhecida há bastante tempo, ainda perde muito espaço para a monta natural na reprodução equina. Esforços crescentes na divulgação entre os criadores de cavalo são necessários para a popularização do método.

O pequeno criador ainda tem acesso restrito, devido principalmente ao custo elevado e necessidade de mão-de-obra especializada para a realização da técnica.

Entraves prejudicam a utilização do sêmen criopreservado e extenuantes e constantes pesquisas são ainda necessárias para melhorar o aproveitamento na criopreservação de sêmen de reprodutores que não apresentam bons resultados na tentativa de criopreservação de seus espermatozóides.

Como um dos fatores responsáveis por este baixo aproveitamento, pode-se citar a alta vulnerabilidade do espermatozóide equino aos efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROS) (BALL et al., 2000). Embora em baixas concentrações, as EROS participam ativamente da fisiologia dos espermatozóides (KANKOFER et al., 2011), em altas concentrações podem provocar danos na membrana plasmática e capacidade fertilizante do espermatozóide (HECKENBICHLER et al., 2011)

É notório também que o fator raça possui enorme contribuição na resistência dos espermatozoides na técnica de criopreservação. A raça Mangalarga Marchador apresenta resultados insatisfatórios na criopreservação de sêmen quando comparados às raças de salto ou a raça Quarto de Milha (CANDEIAS et al., 2012).

Na criopreservação boa parte do líquido seminal é removida, enfraquecendo ainda mais a resistência dos espermatozóides frente as EROS, visto que o plasma seminal possui uma grande capacidade antioxidante (BALL, 2008).

Os antioxidantes previnem ou combatem os danos gerados ao espermatozóides pelas EROS, diminuindo a vulnerabilidade dos mesmos (BANSAL & BILASPURI, 2011).

Neste sentido, estudos comprovam a eficiência da adição de antioxidantes, entre eles a cisteína e a glutathiona, aos diluentes de congelamento, melhorando com isto, a viabilidade do espermatozóide equino após o descongelamento do sêmen (OLIVEIRA et al., 2013).

Desta forma o objetivo do presente experimento foi avaliar o efeito *in vitro* da adição de cisteína em um protocolo de congelamento em garanhões da raça Mangalarga Marchador.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura da célula espermática

A cabeça do espermatozóide do cavalo possui a forma elíptica, sendo um pouco mais espessado na porção distal. Divide-se em núcleo e acrossoma. O núcleo contém cromatina fortemente condensada, o DNA (JUHÁSZ et al, 2000), carregando um número haplóide de 32 cromossomos (SQUIRES et al, 1999).

O acrossoma é uma estrutura vesicular que contém enzimas hidrolíticas, entre elas, hialuronidase e acrosina (CARVALHO & DODE, 2010), que possuem como principal função auxiliar o espermatozóide a penetrar na zona pelúcida (SQUIRES et al, 1999). Isso ocorre após a liberação das enzimas e acontece quando a membrana acrossomal externa se funde com a membrana plasmática (vesiculação), fenômeno conhecido como capacitação espermática (CARVALHO & DODE, 2010). A hialuronidase liberada dispersa as células do cumulus que envolvem o ovócito recém ovulado. A função da acrosina é ajudar a penetração do espermatozóide dissolvendo o caminho através da zona pelúcida.

A cauda ou flagelo do espermatozóide de mamíferos é constituída por colo, peça intermediária, principal e terminal (CARVALHO & DODE, 2010). A peça intermediária abriga as mitocôndrias e é a responsável em fornecer energia ao espermatozóide (SQUIRES et al., 1999), sendo o local onde se inicia os movimentos da cauda (JUHÁSZ et al., 2000). A parte central da peça intermediária, junto com o comprimento total da cauda forma o axonema. Ele é composto de nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois filamentos centrais, circundados por sua vez por nove densas fibras. O axonema e as densas fibras são recobertos periféricamente por numerosas mitocôndrias (HAFEZ & HAFEZ, 2004). A peça terminal, contém apenas o axonema central recoberto pela membrana plasmática. O axonema é o responsável pela motilidade espermática (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

SCHOBBER (2007) sinalizou que a motilidade do espermatozóide é um pré-requisito na obtenção de altas taxas de fertilidade e que acontece quando há uma movimentação contínua do filamento axial do espermatozóide que é dependente da disponibilidade de energia.

Para que ocorra a fecundação existe a necessidade da interação de um ovócito maduro e viável com um espermatozóide móvel, plenamente capacitado e capaz de sofrer a reação acrossômica (CARVALHO & DODE, 2010).

O espermatozóide é uma célula complexa e multicomportamental que deve possuir muitos diferentes atributos para fertilizar um ovócito. Cada espermatozóide deve possuir: motilidade; mitocôndrias ativas para suprir a energia necessária pela motilidade; membranas acrossomais intactas permitindo que ocorra a reação acrossomal, mas somente no momento correto; receptores que permitam que a célula se ligue a zona pelúcida e ao oolema; membrana plasmática que permita a fusão com o oolema e um núcleo capaz de sofrer adequada descondensação, reorganização nuclear e uma performance genética para manter o desenvolvimento zigótico e embrionário (GRAHAM & MOCÉ, 2005).

2.2 Análises do sêmen

Após a coleta, o sêmen deve ser filtrado e colocado em um recipiente graduado para verificação do volume e mantido em banho-maria (SAMPER et al., 2007).

A avaliação da fertilidade de um garanhão é uma das características mais subjetivas na reprodução equina. Parâmetros tradicionais de avaliação (motilidade progressiva, morfologia, integridade de membrana), utilizados para avaliar a qualidade espermática, não se correlacionam com fertilidade. Análises bioquímicas tem sido desenvolvidas para avaliação do sêmen equino e verificam a correlação entre os defeitos na função espermática e stress oxidativo, devido à excessiva produção de EROS e/ou deficiência na proteção antioxidante no trato reprodutor feminino (MORTE et al., 2008).

A motilidade é com certeza uma rápida e fácil característica para avaliar-se. No entanto, ela está pouco relacionada com a fertilidade (JASKO, 1992). Muitas vezes amostras de sêmen possuem uma aceitável motilidade espermática e uma baixa capacidade fertilizante, devido aos danos sofridos pela membrana espermática (NASCIMENTO et al., 2008).

A motilidade é um dos parâmetros mais importantes visualizados no sêmen in natura e no sêmen criopreservado. A avaliação da motilidade espermática é uma informação importante do status energético do espermatozóide animal. Variações entre 30 a 60% dos mesmos ejaculados tem sido observadas em subjetivas avaliações microscópicas de sêmen humano e animal. O

desenvolvimento do software CASA (computer-assisted semen analyses) que analisa e salva os resultados observados representou uma contribuição gigantesca na análise da avaliação espermática, facilitando a comparação de resultados tornando possível com isso, encontrar diferenças sutis entre reprodutores e tratamentos (CONTRI et al., 2010).

No entanto, podem existir amostras com boa motilidade e com baixa fertilidade, devido aos danos sofridos pelas membranas espermáticas. Assim, juntamente com a análise do CASA, é importante avaliar-se a integridade e função das membranas espermáticas (NASCIMENTO et al., 2008).

CARVALHO & DODE (2010), citam que rotineiramente, a avaliação da fertilidade de uma amostra é realizada pela análise física e morfológica do sêmen, que envolve concentração, motilidade, vigor e morfologia espermática. Entretanto para ser capaz de fecundar um ovócito, o espermatozóide, além de ter morfologia e espermatozóides normais, precisa passar pela capacitação espermática e reação acrossômica. Estes eventos são essenciais para que ocorra a ligação e a passagem pela zona pelúcida durante a fecundação.

Dentre os parâmetros cinemáticos mais estudados do CASA pode-se citar: VCL significando a velocidade do deslocamento real do espermatozóide; VAP que é a velocidade curvilínea do espermatozóide sobre um trajeto uniforme, desconsiderando seu deslocamento lateral. A frequência de batimento flagelar (BCF) é determinada pela medida da frequência que o espermatozóide atravessa a trajetória. A Retilinearidade (STR) é obtida pela divisão entre VSL/VAP, ou seja, é uma comparação da linha reta com a média do caminho do espermatozóide. A Linearidade (LIN) é obtida pela divisão VSL/VCL, ou seja, é uma comparação da linha reta com o caminho curvilíneo do espermatozóide (MORTIMER, 1997).

Correlações fortemente positivas entre motilidade progressiva e parâmetros de velocidade indicam que o espermatozóide com boa velocidade progressiva linear, percorre distâncias maiores em um curto período de tempo (KATHIRAVAN et al., 2008).

A integridade da membrana plasmática é essencial para a manutenção da viabilidade espermática. Diversos métodos de coloração foram desenvolvidos para verificar se houve rompimento da membrana. O princípio desta técnica é a expulsão do corante, concluindo que o corante não pode penetrar pela membrana intacta, porém cora o espermatozóide danificado devido à afinidade do corante em ligar-se ao núcleo (JUHÁSZ et al., 2000).

A reação acrossômica fisiológica é um processo bem coordenado que somente ocorre em espermatozoides vivos e é chamado de reação acrossômica verdadeira. Por outro lado, a perda do acrossoma também pode ocorrer devido a alterações degenerativas na membrana (congelamento), a qual é chamada de “falsa reação acrossomal” (JUHÁSZ et al, 2000). Recentemente a integridade acrossomal tem sido mensurada por meio de sondas fluorescentes (PAPA et al., 2011).

2.3 Criopreservação

A criopreservação e armazenamento de sêmen representou um grande avanço na área das biotecnologias reprodutivas permitindo uma melhor utilização de animais com alto potencial genético. Além disso, esta tecnologia possibilitou preservar o material genético de animais incapazes de se reproduzirem temporariamente ou permanentemente permitindo o envio de sêmen para longas distâncias, o que é considerado o melhor seguro biológico para ganhões com alto valor genético, devido também o sêmen poder ser utilizado após a morte do reprodutor (MELO et al., 2007).

A utilização do sêmen equino criopreservado é limitado em grande parte devido a variabilidade existente entre os ganhões e entre os ejaculados de um mesmo reprodutor na sobrevivência dos espermatozoides após o congelamento e descongelamento, diminuindo com isso, a fertilidade do sêmen (VIDAMENT et al, 1997).

Em um experimento utilizando mais de 30 ganhões, VIDAMENT et al. (1997) relatou que 20 a 40% dos mesmos apresentaram baixa congelabilidade, ao passo que 14 a 20% possuíam boa qualidade do sêmen após o descongelamento. BALL (2000), afirmou que 25 a 40% dos ganhões não são aprovados para criopreservação ou transporte de sêmen resfriado devido à baixa sobrevivência espermática após armazenamento.

Já foi comprovado que o fator raça interfere diretamente na resistência dos espermatozoides na criopreservação. A raça Mangalarga Marchador mostrou resultados insatisfatórios relacionados à criopreservação do sêmen quando comparados às raças de salto ou a raça Quarto de Milha (CANDEIAS et al., 2012).

Em particular as raças brasileiras, Mangalarga e Mangalarga Marchador são menos resistentes ao processo de congelação. Alguns autores acreditam que a

variabilidade no que diz respeito à resistência dos espermatozóides ao processo de congelação esteja relacionada a fatores genéticos (ALVARENGA & PAPA, 2011).

MEDEIROS (2007) concluiu que garanhões da raça Mangalarga Marchador apresentaram maior sensibilidade aos crioprotetores evidenciado por uma menor resistência osmótica dos espermatozóides durante o processo de congelação.

GOMES et al. (2002) utilizando 15 garanhões da raça Mangalarga Marchador em um experimento que comparava dois diluentes de congelamento, obteve como motilidade progressiva (8,8% X 23,26%) e motilidade total (21,46 X 49%).

Segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) a motilidade mínima após a descongelação de sêmen de equinos é de 30%.

O que dificulta sobremaneira a utilização do sêmen congelado é o custo associado com intenso manejo das éguas (AVANZI et al., 2012). Os índices de prenhez relativamente baixos do sêmen congelado em relação ao sêmen fresco ou resfriado são comuns e geralmente aceitáveis como resultado de danos sofridos pelo espermatozóide durante o processo de congelamento e o descongelamento (SIEME et al., 2003).

A primeira prenhez oriunda de sêmen equino congelado foi realizada em 1957 por Barker e Gandier (AMANN & PICKET, 1987).

Muitos fatores devem ser considerados quando o sêmen de um garanhão é congelado. Entre eles pode-se enumerar: a exposição do espermatozóide ao resfriamento, danos sofridos em consequência da formação de cristais de gelo e mudanças intracelulares devido a desidratação associada com a formação de gelo durante o congelamento (AMANN & PICKET, 1987).

Quando o sêmen é congelado abaixo de 0°C, cristais de gelo extracelular começam a se formar. Isso ocorre em virtude de um aumento na concentração de soluto no meio extracelular. Inicialmente, a água dentro do espermatozóide não se congela, é resfriada abaixo do ponto de congelamento e move-se de dentro do espermatozóide para o meio extracelular, tornando o espermatozóide progressivamente desidratado. Se a água não sair rapidamente do espermatozóide, ocorrerá a formação de gelo intracelular. Cristais de gelo intracelular provavelmente danificam a célula ao passo que gelo extracelular não causa danos irreversíveis à mesma. Se a curva de congelamento for muito lenta, a alta concentração de soluto intracelular produzidos na desidratação podem danificar o espermatozóide. Se a curva for muito rápida, então cristais de gelo intracelular podem se formar. Uma

curva de congelamento ideal seria uma combinação entre estes fatores (AMANN & PICKET,1987).

Crioprotetores devem ser então adicionados ao diluente para possibilitar a sobrevivência do espermatozóide após o descongelamento (AMANN & PICKET,1987). Os crioprotetores podem ser classificados em penetrantes e não penetrantes. O glicerol é o crioprotetor penetrante mais comum utilizado na criopreservação do sêmen equino, agindo também intra-celularmente na proteção das estruturas celulares. O glicerol aumenta a quantidade de canais não congelados de água e dilui a alta concentração do soluto. Crioprotetores não penetrantes, como a lactose e lipoproteínas encontradas na gema do ovo, agem somente no meio extracelular. Estes crioprotetores desidratam o espermatozóide, reduzindo assim a possibilidade de que grandes cristais de gelo se formem dentro da célula (SQUIRES et al, 1999).

Mesmo na presença de crioprotetores significantes alterações podem ocorrer no acrossomo, na mitocôndria e na membrana plasmática (CHATTERJEE & GAGNON, 2001).

Um primeiro stress que o espermatozóide do garanhão deve ter que suportar durante a criopreservação é o resfriamento da temperatura corporal a 5°C. Se o resfriamento for executado de uma forma inadequada, não seguindo uma curva ideal de resfriamento, o espermatozóide submete-se a um fenômeno conhecido como choque térmico (SQUIRES et al., 1999).

O sucesso da criopreservação depende em grande parte da susceptibilidade das células espermáticas em resistir a baixas temperaturas. Para CHATTERJEE & GAGNON (2001) o congelamento e descongelamento, as duas principais etapas da criopreservação dos espermatozóides, tem maiores efeitos na função e estrutura celular.

A reduzida longevidade do espermatozóide criopreservado no trato reprodutor feminino é particularmente um transtorno em espécies como a equina, que possui um estro relativamente prolongado, requerendo com isso, um cuidado especial no momento da inseminação e ovulação (THOMAS et al, 2006).

O processo de congelamento e descongelamento do sêmen produz estresse físico e químico na membrana espermática reduzindo a viabilidade espermática e a habilidade fertilizante. Ambos, choque frio e os danos provocados pela criopreservação, estão associados com EROS e geração de estresse oxidativo (STRADAIOLI et al., 2007).

O choque térmico também induz peroxidação lipídica durante a criopreservação (CHATTERJEE & GAGNON, 2001).

O processo de peroxidação lipídica causa danos à membrana plasmática, reduz a motilidade e capacidade fecundante dos espermatozoides, induz a capacitação prematuramente e a descondensação nuclear. Uma das causas da diminuição da viabilidade espermática após o congelamento ou resfriamento do sêmen é a produção de EROS, que é produzida a partir do metabolismo do oxigênio (O₂) (BALL et al., 2000).

Durante o descongelamento dos espermatozoides, a temperatura muda repentinamente de -196 para + 38 °C em 60 segundos. Esse súbito aumento desencadeia uma rápida transição da forma sólida para forma líquida gerando um aumento drástico na produção de EROS que pode ser a causa para a baixa motilidade do sêmen congelado (CHATTERJEE & GAGNON, 2001).

A combinação do estresse osmótico e do estresse térmico ao espermatozoide resulta na diminuição do transporte de água pela membrana plasmática. Devido o transporte de água ser um importante fator para a sobrevivência do espermatozoide durante o congelamento e o descongelamento, estas alterações que ocorrem no manuseio do sêmen antes do congelamento devem ser consideradas uma variável importante no resultado da criopreservação do sêmen do garanhão (BALL, 2008).

De acordo com AMANN & PICKET (1987) para o espermatozoide fertilizar um ovócito, ele deve possuir pelo menos quatro importantes características após o congelamento e descongelamento: metabolismo para produção de energia; motilidade progressiva; enzimas, situadas no acrossoma, essenciais para o espermatozoide atravessar as estruturas que revestem o ovócito; proteínas na membrana plasmática que são importantes para a sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo feminino, e para fixação do espermatozoide na membrana plasmática do ovócito na fecundação.

Recentemente foi demonstrado em bovinos, que a peroxidação do espermatozoide congelado e descongelado está claramente associada somente a células viáveis e o processo está localizado principalmente na peça intermediária e cauda do espermatozoide. Além disso a maior parte dos fosfolípidos envolvidos estão localizados no folheto interno da membrana da célula (STRADAIOLI et al., 2007).

Durante a criopreservação, o espermatozóide tem um aumento da concentração do cálcio intracelular, um aumento na geração de EROS, e uma reduzida capacidade antioxidante devido à remoção do plasma seminal. Estes fatores por sua vez podem levar a uma prematura capacitação do espermatozóide com uma conseqüente redução na longevidade do sêmen criopreservado (BALL, 2008).

Aparentemente a avaliação da motilidade retilínea progressiva de espermatozóides congelados é menor, mostrando que são menos resistentes à peroxidação lipídica que espermatozóides resfriados, indicando que a mesma deve ser mais um problema no sêmen congelado que no resfriado (NEID et al., 2002).

A membrana plasmática é fluida à temperatura corporal (JUHÁSZ et al., 2000) e isto ocorre, devido ao arranjo dos fosfolípidos e proteínas que se movimentam lateralmente pela membrana em seus diversos compartimentos. Na criopreservação esta organização se altera para o estado gel, impossibilitando a movimentação dos lipídeos e proteínas pela membrana (SQUIRES et al., 1999). Estas alterações bruscas nesta organização, podem permitir a passagem rápida de moléculas, que antes atravessariam a membrana plasmática de uma maneira bem lenta (AMANN & PICKET, 1987), acarretando danos permanentes à membrana (SQUIRES et al., 1999).

SCHOBBER et al. (2007) enfatizaram que uma das causas para o baixo aproveitamento do sêmen criopreservado na IA são os danos sofridos pelas mitocôndrias durante o processo de congelamento e descongelamento, comprometendo com isso, o metabolismo energético do espermatozóide e prejudicando a movimentação ao longo da tuba uterina, assim como, a penetração na zona pelúcida que é dependente de energia. Esta disfunção das mitocôndrias seria responsável pela produção das EROS por espermatozóides anormais, podendo ser a explicação para a causa de diminuição de fertilidade de certos reprodutores (BALL et al., 2000).

2.4 Espécies reativas de oxigênio

Espécies reativas de oxigênio (EROS) ou oxidantes podem ser definidos como moléculas contendo oxigênio que são mais reativas que a molécula de oxigênio presente no ar (KIRSCHVINK et al., 2008).

Todos os organismos aeróbicos necessitam de oxigênio para viver. Embora seja um elemento essencial, o oxigênio é responsável pela produção de

EROS (COCCHIA et al., 2011) e a estrutura celular do espermatozóide torna-os potencialmente susceptíveis. Isto acontece porque as membranas espermáticas dos espermatozóides são ricas em ácidos graxos poliinsaturados e podem sofrer facilmente peroxidação lipídica na presença de EROS, portanto, os principais alvos são os lipídios contidos na membrana celular (SICHERLE et al., 2011), levando a alterações na permeabilidade da membrana (KANKOFER et al., 2005), induzindo a danos no DNA no núcleo do espermatozóide ao esgotar a Adenosina tri-fosfato (ATP) na mitocôndria (COCCHIA et al, 2011), causando com isso, perda de função e morte espermática, culminando na redução da fertilidade (KANKOFER et al., 2005).

Baixas concentrações de EROS desempenham um importante papel na fisiologia do espermatozóide ao passo que altas concentrações são prejudiciais (KANKOFER et al, 2005). Na fisiologia do espermatozoide as EROS são importantes no processo de capacitação, na ajuda da fertilização do ovócito, e, além disso, o peróxido de hidrogênio deve participar como indutor na reação acrossomal. Portanto, concentrações mínimas de EROS são indispensáveis para manter o funcionamento de uma célula normal (COCCHIA et al., 2011).

Quando em altos níveis as EROS podem provocar danos na membrana plasmática, levando com isso a uma perda da motilidade espermática e capacidade fertilizante do espermatozóide (HECKENBICHLER et al., 2011).

No melhor cenário, o espermatozóide alcança o local da fertilização e completa a capacitação no momento que o oócito estiver presente. No entanto, a criopreservação provoca uma perda de lipídeos das membranas do espermatozóide e rearranjo dos lipídeos e proteínas dentro da membrana, gerando um espermatozóide pré-capacitado, resultando com isso, em uma reduzida vida útil fertilizante do mesmo (GRAHAM & MOCÉ, 2005).

A produção das EROS inicia-se tão logo o espermatozóide deixa a cauda do epidídimo (SICHERLE et al., 2011). Danos aos espermatozóides equinos produzidos pelas EROS aparece primeiramente como uma perda da motilidade espermática que ocorre rapidamente após a exposição a EROS. A perda da motilidade parece ocorrer devido ao rompimento do metabolismo energético do espermatozóide antes da morte das células (BALL, 2000).

Maior motilidade é o resultado de um espermatozóide fisiologicamente funcional, e espermatozóide com diminuição da motilidade é indicativo de redução do metabolismo espermático e falha das organelas (DEL OLMO et al., 2013).

Sob condições fisiológicas, O_2 sofre uma redução tetravalente com aceitação de quatro elétrons, resultando em formação de água ($2 H_2O$). Contudo, moléculas quimicamente reativas são formadas durante este processo, incluindo 2 radicais: superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-) e um não radical, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Embora o ânion superóxido seja o primeiro produto gerado pelo espermatozóide (BALL, 2008), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é considerado o mais importante das espécies devido a sua capacidade para atravessar membranas livremente e para inibir as atividades das enzimas e funções celulares, assim como diminuir as defesas antioxidantes do espermatozóide (MICHAEL et al., 2007).

Um aumento na produção de EROS pelo espermatozóide equino pode ocorrer na presença de grande quantidade de espermatozoides anormais ou danificados (BALL, 2008) e por leucócitos contaminantes (KANKOFER, 2005) no sêmen prejudicando espermatozoides viáveis devido a um aumento do stress oxidativo.

Quando a produção de EROS pela mitocôndria do espermatozóide é excessiva, então a limitada defesa endógena dos gametas são rapidamente sobrecarregadas e o dano oxidativo é induzido (AITKEN & FISHER, 1994).

BRINSKO et al. (2003) citam dois experimentos que comprovam o prejuízo ao sêmen por espermatozoides mortos. Em um deles, 20 minutos após a adição de espermatozoides mortos pelo choque frio ao sêmen, a motilidade e viabilidade foram seriamente comprometidas. Em outro estudo, a retirada de espermatozoides mortos ou anormais por filtração em Sephadex aumentou em 60% a fertilidade de sêmen de touros.

2.5 Antioxidantes

O estudo dos radicais livres iniciou-se em 1954 quando Gerschman e colaboradores publicaram a teoria dos radicais livres de oxigênio e quando, dois anos mais tarde, Harman publicou a teoria dos radicais livres no envelhecimento. O campo ganhou mais atenção em 1969 quando McCord e Fridovich descobriram a enzima superóxido dismutase (KIRSCHVINK et al., 2008).

Antioxidantes estão incluídos no sistema de defesa contra os oxidantes que implicam: sistemas que previnem a formação das EROS; sistemas antioxidantes que inativam os oxidantes e sistemas capazes de limitar os efeitos deletérios dos oxidantes permitindo o reparo dos danos oxidativos (KIRSCHVINK et al., 2008).

O estresse oxidativo tem sido definido como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes. O estresse oxidativo ocorre quando o sistema de defesa antioxidante é sobrecarregado por um aumento na carga oxidante ou na redução da oferta de antioxidantes (KIRSCHVINK et al., 2008).

Segundo BALL (2008), os efeitos do estresse oxidativo são particularmente importantes durante o armazenamento do espermatozóide tanto no resfriamento quanto no congelamento, e este dano é ainda maior em situações que grande parte do líquido seminal é removido, devido a maior capacidade antioxidante encontrar-se no plasma seminal. A atividade antioxidante enzimática no espermatozóide equino parece ser predominantemente derivada do plasma seminal adsorvido na membrana plasmática (BAUMBER & BALL, 2001).

Sob condições fisiológicas, uma menor geração de EROS é estimulada na presença de cálcio, e a NADPH oxidase associada à membrana, NOX5, aparece como sendo o provável mecanismo para geração de EROS. Esta menor produção de EROS pelo espermatozóide equino é importante na capacitação do espermatozóide. A habilidade de baixas concentrações de EROS de induzir a capacitação também influencia na preservação do espermatozóide (BALL, 2008).

Devido o descarte da maior parte do citoplasma do espermatozóide durante o estágio final da diferenciação, estes tem uma defesa limitada contra o estresse oxidativo e são dependentes do reforço antioxidante do plasma seminal (BAUMBER et al, 2005).

Sistemas antioxidantes controlam o equilíbrio entre a produção e neutralização das EROS e protegem o espermatozóide contra danos peroxidativos (COCCHIA et al., 2011). SICHERLE et al. (2011) relataram que, embora o espermatozóide contenha enzimas antioxidantes intracelulares ao deixarem o epidídimo, também é protegido por enzimas antioxidantes do plasma seminal.

No sêmen de mamíferos, a capacidade de defesa antioxidante consiste de sistemas enzimáticos e não enzimáticos, sendo a glutathione a maior representante deste último grupo (LUBERDA, 2005). Entre as enzimas pode-se citar: superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, e glutathione reductase, assim como os componentes não enzimáticos as vitaminas C e E, albumina, taurina e hipotaurina (SICHERLE et al., 2011).

A glutathione (GSH), um tiol tripeptídeo, é o maior composto protéico não sulfidrílico em células de mamíferos, que é conhecida por desempenhar numerosas funções biológicas. A glutathione existe em duas formas: a forma reduzida (GSH) e a

forma oxidada (GSSG). A ação protetora da glutathione contra as EROS é facilitada pela interação com suas enzimas associadas, tais como glutathione peroxidase e glutathione reductase (LUBERDA, 2005).

O sistema antioxidante tiol, representados principalmente pela glutathione, domina no sêmen de garanhões e ocorre em grandes quantidades no plasma seminal. O teor de GSH no presente fluido é mais de 10 vezes superior à de sêmen de javali (LUBERDA, 2005).

No homem uma alta ingestão de antioxidantes está associado com sêmen de melhor qualidade, incluindo maior número de espermatozoides e uma melhor motilidade (CONTRI et al., 2011).

Em um experimento conduzido por CONTRI et al (2011) verificou-se que uma suplementação diária com selênio (Se) resultou em aumento da capacidade antioxidante do sêmen, que pode ser explicado por um acréscimo na glutathione peroxidase ou outra enzima relacionada com a atividade do Se. Esse fato pode explicar a razão de uma dieta suplementada com Se orgânico aumentar a qualidade no sêmen do garanhão. Essa melhoria na qualidade do sêmen também foi observada na suplementação com a vitamina E. Os achados encontrados sugerem que o papel antioxidante da vitamina E possa ser devido a uma incorporação na membrana plasmática do espermatozoide durante a espermatogênese ou maturação epididimal mas não devido a uma atividade antioxidante da vitamina E livre no plasma seminal.

Uma maneira para melhorar a viabilidade espermática e, conseqüentemente a capacidade de fertilização seria a adição de antioxidantes ao diluente de congelamento (OLIVEIRA et al., 2013). Nos últimos anos, os antioxidantes tem sido utilizados para proteger os espermatozoides dos efeitos nocivos da criopreservação. Glutathione é um dos antioxidantes mais adicionados às diferentes amostras de sêmen. Ela é um reservatório natural para reações redox, a qual pode ser rapidamente utilizada para defender as células contra o stress oxidativo (OLIVEIRA et al., 2013).

O estresse oxidativo tem sido considerado um dos fatores de maior impacto na fertilidade masculina pelo aumento no dano celular, em especial na membrana plasmática, e uma das estratégias propostas para reduzir esse dano é a adição de substâncias com ação anti oxidante ao meio diluente utilizado para preservação seminal. Anti oxidantes são agentes que quebram a cadeia de reação oxidativa retirando, suprimindo ou inativando as EROS. A L-acetil-cisteína é um

agente não enzimático, precursor da glutathiona, que atravessa facilmente a membrana plasmática e aumenta a biossíntese de glutathiona, favorecendo a eliminação rápida dos radicais livres, e sua adição ao meio diluente utilizado para sêmen de ruminantes foi benéfica para a preservação da motilidade pós descongelamento (BANSAL & BILASPURI, 2011).

O axonema e as fibras densas associadas da peça intermediária do espermatozóide são cobertas por mitocôndrias que geram energia a partir de reservas intracelulares de ATP, sendo responsável com isso, pela motilidade espermática (LAMIRANDE & GAGNON, 1992).

O sêmen equino é rico na enzima catalase, produzida primariamente pela próstata. Existe uma marcante variação entre os reprodutores na atividade da catalase presente no sêmen. Garanhões com baixa atividade da catalase podem ser mais suscetíveis ao estresse oxidativo durante o armazenamento do sêmen (BALL et al, 2000). A alta atividade da catalase no sêmen do garanhão normal sugere que EROS que são produzidas são rapidamente degradadas antes que causem algum efeito prejudicial ao espermatozóide (BALL, 2000).

A catalase é a enzima que degrada o peróxido de hidrogênio, protegendo o espermatozóide contra os danos do peróxido de hidrogênio, que é normalmente presente em grandes quantidades no sêmen equino (BALL, 2000).

Os produtos residuais finais originários da fosforilação oxidativa, tais como as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT) ou hidroxinonenal também exercem efeitos tóxicos e podem diminuir a motilidade espermática. Estes produtos podem servir como indicadores bioquímicos da peroxidação lipídica (KANKOFER et al, 2005).

Ao sujeitar os espermatozóides ao estresse oxidativo durante o processo de criopreservação, ativa-se a fosfotirosina regulando a transdução de sinal. O estresse oxidativo ativa a ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) (THOMAS et al, 2006). Um produto da fosforilação lipídica é o malondialdeído (MDA), que pode ser determinado pela quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRAT). Um alto nível de EROS também pode resultar em oxidação proteica, levando a produção de grupos carbonila. Conseqüentemente, a determinação da carbonila presente nas proteínas pode ser usado como um biomarcador dos danos oxidativos proteicos e vários métodos tem sido desenvolvidos para determinação e quantificação de proteínas dos grupos carbonila (MORTE et al, 2008).

Em humanos um aumento expressivo na ERK pode ser sugestivo de baixa qualidade dos espermatozoides e pode ser um indício do estresse oxidativo. Existe correlações inversamente proporcionais entre a ERK e motilidade espermática, motilidade progressiva, morfologia espermática e viabilidade (COCCHIA et al., 2011).

Em um experimento conduzido por Bustamante et al. (2006), estudou-se em seis garanhões da raça Crioula a atividade das enzimas glutathiona peroxidase e catalase durante a criopreservação do sêmen. A conclusão foi que as técnicas de criopreservação padrões diminuía a atividade das enzimas catalase e glutathiona peroxidase e que os protocolos de congelamento não afetaram as atividades enzimáticas residuais no sêmen diluído. Esta informação deve contribuir com os estudos que otimizem os protocolos de congelamento de sêmen pela adição de enzimas antioxidantes ao diluente.

Em outro estudo COCCHIA et al. (2011) utilizaram cinco garanhões da raça Puro Sangue Inglês e verificou o desempenho da adição de Superóxido Dismutase (SOD) ao diluente de congelamento em duas alíquotas : 25 UI/ml e 50 UI/ml. Os autores concluíram que a adição de SOD ao diluente melhorou a qualidade do sêmen resfriado e reduziu a ERK ativação.

2.6 Inseminação artificial

A primeira IA bem sucedida que se tem notícia data de 1322, quando o sêmen de um garanhão Árabe foi recolhido da vagina de uma égua recém coberta transportado em leite de camela e depositado no útero de outra égua gerando um potro (MORRIS, 2006).

Segundo MIES FILHO (1987), as primeiras inseminações artificiais ocorreram no Brasil entre 1931 e 1932 em éguas do exército no Rio Grande do Sul.

A IA oferece segurança, diminuindo os risco na transmissão das doenças sexualmente transmissíveis e uma otimização dos índices gestacionais quando comparados com a cobertura natural (GAHNE, 1997), pois o processo irá ocorrer sob a supervisão de médicos veterinários especializados em reprodução equina, e a inseminação irá ocorrer em um momento ótimo economizando tempo gasto em manejos desnecessários (DAVIES MOREL, 2005).

Entre outras importantes conquistas adquiridas pelo método KATILA (2005) lembra a redução nos custos de transporte, a diminuição dos riscos em potenciais com a segurança dos animais durante o transporte e o acesso a material

genético de alta qualidade. DAVIES MOREL (2005) complementa dizendo que os garanhões podem estar instalados a grandes distâncias, inclusive no exterior, além da ampliação no número de reprodutores utilizados nos acasalamentos das matrizes. Permite também a utilização de reprodutores mortos, por meio de sêmen congelado (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Pode ser citado como desvantagens que um número mínimo de 20 éguas deverão ser cobertas por um garanhão fértil em cada estação reprodutiva para tornar a inseminação artificial uma ferramenta valiosa de manejo reprodutivo e que mão de obra qualificada que compreenda fisiologia básica do garanhão e da égua deverão ser contratadas (PICKETT & VOSS, 1999).

Inúmeros fatores podem influenciar o índice de prenhez em éguas inseminadas. Entre eles incluem-se os fatores inerentes da égua e do garanhão, o tipo de sêmen utilizado na inseminação, o número de espermatozóides na dose inseminante, a concentração do diluente e o tempo que o sêmen refrigerado irá aguardar até o momento da I.A (SIEME et al., 2003). A inseminação pode ser com sêmen fresco recém coletado, diluído com diluidores permitindo-se estocagens por até 48 horas ou criopreservado em nitrogênio líquido (KATILA, 2005).

Nos anos recentes, a maioria das associações de raças tem permitido a adoção da IA. A maioria delas tem aceitado a utilização do sêmen refrigerado a 5°C e transportado entre propriedades nas mais diferentes e distantes localidades do mundo (PICKETT & VOSS, 1999).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito *in vitro* do congelamento de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador com meio suplementado de L-acetil-cisteína.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar os resultados dos parâmetros espermáticos dos espermatozoides criopreservados sem e com adição de L-acetilcisteína.

- ✓ Avaliar a contribuição da L-acetil-cisteína em um protocolo de criopreservação de sêmen equino.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do experimento e animais utilizados

O experimento foi desenvolvido no laboratório da Central Estábulo-Sobradinho/DF, CENARGEN - Brasília/DF e CTZL – GAMA/DF.

Foram utilizados sete garanhões da raça Mangalarga Marchador devidamente registrados na associação de criadores e com fertilidade conhecida em monta natural. Os animais tinham entre 5 e 10 anos de idade, eram criados em regime semi-extensivo. A alimentação consistia em sal mineral e água *ad libitum*, 4kg de concentrado com 12% PB/dia e como volumoso Adropogon, alojados em Sobradinho-DF, entre os meses de setembro e outubro de 2013.

Foi realizado o esgotamento prévio das reservas espermáticas extragonadais, com colheitas em dias alternados, por sete dias. Os animais foram submetidos à avaliação andrológica atendendo aos padrões do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Após o esgotamento foram realizadas três colheitas, em dias alternados, de cada garanhão, totalizando 21 ejaculados criopreservados.

Imediatamente após a colheita do sêmen foi avaliado o volume, aspecto (cor e densidade) e odor. À avaliação microscópica estimou-se os valores de motilidade total e vigor espermáticos. Foram utilizados para o congelamento apenas os ejaculados com motilidade total $\geq 60\%$ e vigor ≥ 4 .

4.2. Adição do antioxidante e criopreservação do sêmen

O sêmen foi diluído na proporção de 1:1 em meio à base de leite em pó desnatado¹ e centrifugado a 600 x g por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de espermatozoides resultante foi ressuspenso com o diluente de criopreservação à base de gema de ovo, glicerol e dimetilformamida², em dois grupos: diluente sem antioxidante (controle) e diluente com 2,5mM de cisteína³ (CIS). Após a diluição as amostras foram envasadas em

¹ Botusêmen – Biotech Botucatu/SP

² BOTU-CRIO – Biotech Botucatu – Botucatu/SP.

³ L-Cysteine - C7352 – Sigma-Aldrig – Japão.

palhetas de 0,5 mL com concentrações ajustadas para 100×10^6 espermatozoides/mL.

As palhetas foram distribuídas em uma plataforma-suporte e estabilizadas a 5°C, em refrigerador comercial, por 20 minutos. Para o congelamento a plataforma foi exposta ao vapor de nitrogênio líquido, sendo as mesmas posicionadas horizontalmente a 6 cm acima do nível de nitrogênio líquido, por 20 minutos. Imediatamente após, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido, acondicionadas em raques e estocadas em botijão criogênico a -196°C, para posterior avaliação.

4.3. Análises laboratoriais do sêmen

As amostras foram descongeladas a 37°C por 30 segundos. Avaliou-se a cinética espermática computadorizada e integridade das membranas plasmática e acrosomal.

Para avaliação da cinética espermática, 2µL de sêmen descongelado foram colocados na lâmina de leitura (Makler[®] counting chamber, Selfi-medical instruments, Califórnia, EUA), sendo a amostra avaliada no aparelho modelo IvoS-Ultimate 12 da *Hamilton Thorne Biosciences*, previamente ajustado (ANEXO I) para análise de sêmen equino (Anexo II). Três campos foram selecionados para leitura e análise. As variáveis mensuradas foram as seguintes: Motilidade total (%; MT), motilidade progressiva (%; MP), velocidade de trajeto (µm/s; VAP), velocidade retilínea (µm/s; VSL), velocidade curvilínea (µm/s; VCL), amplitude lateral de cabeça (µm; ALH), frequência de batimentos (Hz; BCF), linearidade (%; LIN) e retilinearidade (%; STR).



FIGURA 1- Equipamento Computer Assisted Semen Analysis (CASA) utilizado para avaliar os parâmetros cinéticos de movimentos das amostras de sêmen equino

Para avaliação da integridade de membrana plasmática foram utilizadas as sondas fluorescentes iodeto de propídeo (IP) e diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA), conforme técnica descrita por Harrison & Vickers (1990). Foram avaliadas 200 células em microscopia de epifluorescência em aumento de 1000x.

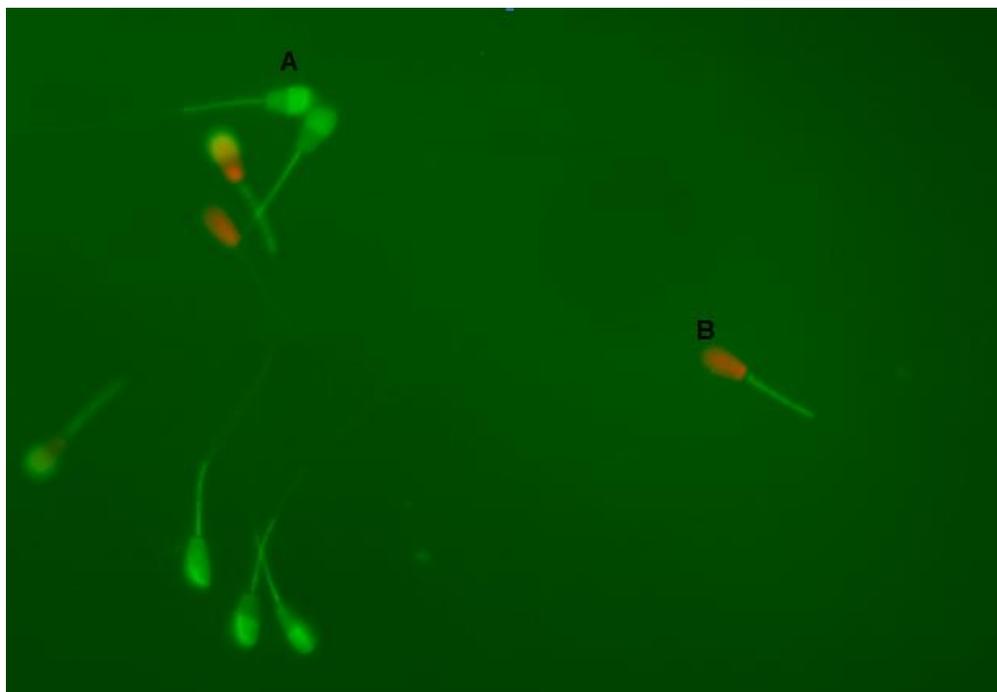


FIGURA 2 - Espermatozoides corados com diacetato de 6 carboxifluoresceína e iodeto de propídeo, demonstrando membrana plasmática íntegra (A) e membrana plasmática lesada (B)

Para integridade da membrana acrossomal foi utilizada a sonda fluorescente isotiocianato de fluoresceína conjugado com a aglutinina do amendoim (*Arachis hypogea*) (FITC-PNA) e iodeto de propídeo (IP), como descrito por Klinc e Rath (2007). Foram avaliados 200 células em microscopia de epifluorescência alternada com o contraste de fase no aumento de 1000x.

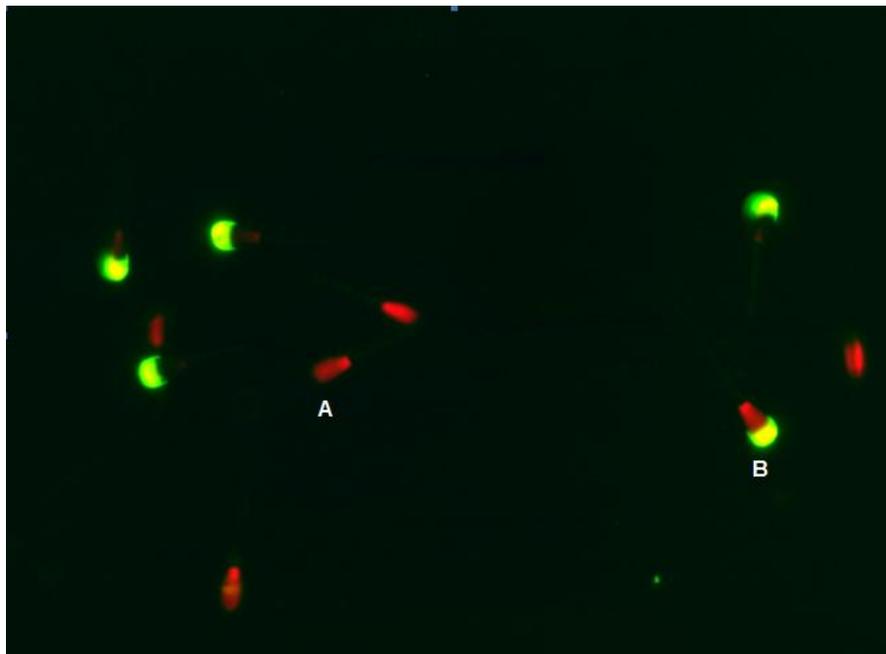


FIGURA 3 - Espermatozoides corados com isotiocianato de fluoresceína conjugado com a aglutinina do amendoim (*Arachis hypogea*), demonstrando espermatozóide LSRA (A) e espermatozóide LCRA (B)

As informações obtidas no trabalho de campo foram editadas em planilhas eletrônicas do aplicativo Excel.

Após as análises de crítica e consistência dos dados para determinar se os erros experimentais das variáveis possuíam distribuição normal de probabilidade e homogeneidade de variância os resultados foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre médias estudadas pelo teste t usando-se o pacote computacional Winstat (FITCH, 2006).

5. RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados relacionados às variáveis de cinética espermática.

TABELA 1 - Cinética espermática pós-descongelamento de sêmen equino criopreservado em meio contendo cisteína

Variável	Tratamentos		
	Controle	Cisteína	P
Motilidade Total	11,38±2,35 ^a	23,95±3,33 ^b	0,003
Motilidade Progressiva	2,04±0,36 ^a	4,66±0,84 ^b	0,006
VAP (um/s)	40,71±1,51	40,8±1,05	0,958
VSL (um/s)	35±1,51	33,47±0,95	0,594
VCL (%)	74,14±1,67	76,55±0,99	0,22
ALH (%)	3,47±0,42	3,62±0,43	0,812
BCF (%)	41,66±1,12	40,28±0,98	0,636
STR (%)	86,95±1,02 ^a	82,28±1,02 ^b	0,002
LIN (%)	49,85±1,32 ^a	45,19±1,17 ^b	0,01

VAP-Velocidade média da trajetória; VSL-Velocidade linear progressiva; VCL-Velocidade curvilínea; ALH-Amplitude deslocamento de cabeça; BCF-Frequência de batimento flagelar cruzado; STR-Retilinearidade; LIN-Linearidade

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença (P<0,05).

Na Tabela 2 estão expostos os resultados relacionados à integridade de membranas dos espermatozoides após o descongelamento.

TABELA 2 - Resultados das análises pós-descongelamento referentes a integridade de membrana plasmática e acrossomal

Variável	Tratamentos		
	Controle	Cisteína	P
Vivos	12,5 ± 2,6	15,1 ± 2,6	0,99
ISRA	24,2±3,60	25,4±3,85	0,82
ICRA	0,8±0,2 ^a	4,7±1,6 ^b	0,02
LSRA	51,8±2,8	52,4±3,6	0,88
LCRA	23,2±3,5	17,5±2,6	0,19

ISRA-Integro sem reação acrossomal; ICRA-Integro com reação acrossomal; LRSA-Lesado sem reação acrossomal; LCRA-Lesado com reação acrossomal
 Letras diferentes na mesma linha indicam diferença (P<0,05).

As motilidades progressiva e total foram significativamente maiores para CIS (P< 0,05), mas as variáveis relacionadas à linearidade (STR e LIN) foram superiores para as amostras Controle (P< 0,05). Os resultados relativos à velocidade espermática (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF) dos espermatozoides após a criopreservação não foram alterados pela adição do antioxidante.

Quanto ao número de espermatozoides vivos, sem considerar a ocorrência ou não de reação acrossomal, não houve diferença entre Controle e CIS. Verificou-se diferença apenas entre o número de espermatozoides íntegros com reação acrossomal, o qual foi superior para CIS (P< 0,05).

6. DISCUSSÃO

As biotecnologias voltadas para a reprodução necessitam de estudos para otimizar os diversos protocolos de criopreservação do sêmen equino.

Os garanhões podem ser classificados em bons ou ruins em relação à congelabilidade do sêmen (COCCHIA et al., 2011). BALL (2000), afirmou que 25 a 40% dos garanhões não são aprovados para criopreservação ou transporte de sêmen resfriado devido à baixa sobrevivência espermática após armazenamento.

Como uma das causas apontadas para esta diminuição na viabilidade espermática, pode-se citar a produção de EROS, que é produzida a partir do metabolismo do oxigênio (O_2) (BALL, 2000). Durante a criopreservação do sêmen do cavalo acontece um aumento na produção de EROS, tornando o espermatozóide um alvo fácil aos efeitos do estresse oxidativo (BAUMBER & BALL, 2001). Outro fator que ocorre na criopreservação é a retirada de grande parte do plasma seminal (BAUMBER & BALL, 2001).

Então uma maneira de melhorar a viabilidade do espermatozóide no processo após a retirada do plasma e principal fonte de proteção contra as EROS, seria a recomendação da adição de antioxidantes ao meio de congelamento para auxiliar na proteção contra os efeitos das EROS (BUSTAMANTE-FILHO et al,2006), evitando assim,que aconteça peroxidação lipídica na membrana celular (SICHERLE et al, 2011) e outras séries de eventos que culminarão na perda de função e morte espermática (KANKOFER et al, 2005).

Com base nesta evidência, testou-se no experimento a ação da cisteína na concentração de 2,5mM na viabilidade de espermatozóides equinos em um protocolo de criopreservação de cavalos da raça Mangalarga Marchador.

A Tabela 1 avalia o efeito da cisteína incorporada ao meio de congelamento para prevenir os efeitos das EROS e aumentar a viabilidade espermática. O axonema e as fibras densas associadas da peça intermediária do espermatozóide são cobertas por mitocôndrias que geram energia a partir de reservas intracelulares de ATP, sendo responsável com isso, pela motilidade espermática (LAMIRANDE & GAGNON, 1992). Os resultados demonstram que a cisteína melhorou significativamente as motilidades progressiva ($4,66 \pm 0,84$ X $2,04 \pm 0,36$) e motilidade total ($23,95 \pm 3,33$ X $11,38 \pm 2,35$) em relação ao tratamento controle, o que pode sugerir a influência protetora da cisteína na integridade funcio-

nal do axonema e mitocôndrias, possibilitando com isso, o aumento na motilidade do sêmen descongelado do grupo CIS. Outros estudos como o de OLIVEIRA et al. (2013), utilizando glutathione em diferentes concentrações (2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10 mM) ao meio de congelamento, concluíram que a concentração de 2,5 mM havia melhorado a motilidade total e mostrado incremento na motilidade progressiva. Esses resultados reforçam os aqui apresentados visto que a cisteína é um precursor da glutathione (BARSAL & BILASPURI, 2011). No entanto, para espermatozoides bovinos (TUNCER et al., 2010) e caninos (NEAGU et al, 2011) a cisteína, nas concentrações de 5 mM e 10 mM, não alterou a motilidade espermática.

Apesar de alguns ganhos terem apresentado um melhor resultado das motilidades progressiva ($4,66 \pm 0,84$ X $2,04 \pm 0,36$) e total ($23,95 \pm 3,33$ X $11,38 \pm 2,35$) após a criopreservação, a média geral ficou abaixo do recomendado de 30% (CBRA,1998). GOMES et al (2002) utilizando 15 ganhos da raça Mangalarga Marchador em um experimento que comparava dois diluentes de congelamento obteve como motilidade progressiva (8,8% X 23,26%) e motilidade total (21,46 X 49%).

Com relação à integridade da membrana plasmática do espermatozoide, apresentada na Tabela 2, geralmente ocorrem quedas esperadas nos valores após a criopreservação. Este fato ocorre devido aos danos sofridos pela membrana plasmática em decorrência da formação de cristais de gelo e mudanças intracelulares devido a desidratação levando a morte celular (AMANN & PICKET, 1987). Os resultados demonstram que houve aumento significativo no percentual de células com membranas íntegras com reação acrossomal de CIS em relação ao controle ($0,8 \pm 0,2$ X $4,7 \pm 1,6$). Confirmando que a cisteína foi capaz de inibir a peroxidação dos lipídeos da membrana durante o armazenamento, demonstrando com isso, a ação protetora da cisteína nas membranas do espermatozoide. Neste aspecto os autores OLIVEIRA et al (2013), TUNCER et al (2010) e NEAGU et al (2010) observaram resultados similares.

Correlações fortemente positivas entre motilidade progressiva e parâmetros de velocidade indicam que o espermatozoide com boa velocidade linear progressiva, percorre distâncias maiores em um curto período de tempo (KATHIRAVAN et al,2008).

As variáveis VCL, VSL e a motilidade total dos espermatozoides de amostras de sêmen descongeladas estão positivamente correlacionadas com fertilidade (VERSTEGEN et al, 2002).

Neste trabalho verificou-se que a adição da cisteína na concentração de 2,5 mM ao meio de congelamento não influenciou os resultados de forma significativa para os parâmetros VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, STR e LIN. Isto indica que os antioxidantes não atuaram na proteção destas características contra as EROS, ou não houve produção significativa de EROS para desafiar as amostras do sêmen. TUNCER et al. (2010) observaram que os parâmetros VCL e VSL mantiveram-se preservados após a adição do antioxidante ao meio de congelamento e OLIVEIRA et al. (2013) conseguiram aumento de ambos parâmetros adicionando glutathione na concentração de 10 mM.

7. CONCLUSÃO

A adição de 2,5 mM de cisteína foi altamente eficaz em preservar a integridade de membrana quando comparada ao tratamento controle.

Os resultados apresentados sugerem que a adição de L-acetil-cisteína ao meio diluente a base de gema de ovo, glicerol e dimetilformamida para criopreservação de espermatozoides de garanhões da raça Mangalarga Marchador pode ser uma alternativa para melhorar a viabilidade desses gametas durante o descongelamento. Mais estudos devem ser conduzidos com essa raça para determinar a melhor concentração de L-acetil-cisteína, assim como os resultados *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- 1- AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioessays**, v.16, p.259-267, 1994.
- 2- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Principais avanços no processamento e aplicação do sêmen congelado de equinos. **Spermova**, v.1, p.7-10, 2011.
- 3- AMANN,R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p.145-173, 1987.
- 4- AVANZI, B.R.; RAMOS, R.S.; ARAÚJO, G.H.M.; FIORATTI, E.G.; GRECO, G.M.; TRINCA, L.A.; DELL'ACQUA, J.A.; MELO, C.M.; PAPA, F.O. Influence of insemination time on pregnancy rates of mares inseminated with frozen semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p. 475- 518, 2012.
- 5- BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Theriogenology**, v.107, p.257-267, 2008.
- 6- BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; BAUMBER, J.; LIU, I.K. Catalase activity in equine semen. **AM. J. VET. RES.**,v. 61, p.1026-1030, 2000.
- 7- BALL, B.A. The effects of oxidative stress on equine sperm function, semen storage and stallion fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, No 2, p. 95-96, 2000.
- 8- BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine Internacional**. V.2011, p.1-7.
- 9- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **AM. J. VET. RES.**,v. 66, p. 772-779, 2005.
- 10- BAUMBER, J.; BALL, B.A. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. **AM. J. VET. RES.**, v. 66, p.1415-1419, 2001.
- 11- BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; RIGBY, S.L.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D. Effects of dead spermatozoa on motion characteristics and membrane integrity of live spermatozoa in fresh and cooled-stored equine semen. **Theriogenology**, v.59, p.735-742, 2003.

- 12- BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; PEDERZOLI, C.D.; SGARAVATTI, A.M.; MATTOS, R.C.; DUTRA-FILHO, C.S.; JOBIM, M.I.M. Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 70-73, 2006.
- 13- CANDEIAS, M.L.; ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T.; FERREIRA, H.N.; MAIOR, M.R.S.; TORRES FILHO, R.A.; RODRIGUES, A.L.R.; BRANDÃO, F.Z. Semen cryopreservation protocols of Mangalarga Marchador stallions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p. 1989-1995, 2012.
- 14- CARVALHO, J.O.; DODE, M.A.N.; Técnica de coloração com *peanut agglutinin* (PNA) – isoticianato de fluoresceína (FITC) para avaliação de integridade de acrossoma de espermatozoides bovinos. **Embrapa Documentos 328**, Brasília:DF, 2010. 21p.
- 15- CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL). **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**: manual de orientação. Belo Horizonte, 1998,49 p.
- 16- CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. **Molecular Reproduction and Development**. v. 59, p.451-458, 2001.
- 17- COCCHIA, N.; PASOLINI, M.P.; MANCINI, R.; PETRAZZUOLO, O.; CRISTOFARO, I.; ROSAPANE, I.; SICA, A.; TORTORA, G.; LORIZIO, R.; PARAGGIO, G.; MANCINI, A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**,v.75, p. 1201-1210, 2011.
- 18- CONTRI, A.; VALORZ, C.; FAUSTINI, M.; WEGHER, L.; CARLUCCIO, A. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.74, p.424-435, 2010.
- 19- CONTRI, A.; DE AMICIS, IPPOLITO; MOLINARI, A.; FAUSTINI, M.; GRAMENZI, A.; ROBBE, D.; CARLUCCIO, A. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. **Theriogenology**,v.75, p.1319-1326, 2011.
- 20-DAVIES MOREL, M.C.G. **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management**. New York: CABI Publishing, 2003.357 p.
- 21- DEL OLMO, E., BISBAL, A. MAROTO-MORALES, A., GARCÍA-ALVAREZ, O.; RAMON, M.; JIMENEZ-RABADAN, P.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal Reproduction Science**. V.138, p.102-109, 2013.

22- GAHNE, S.; GANHEIM, A.; MALMGREN, L. Effect of insemination dose on pregnancy rate in mares. **Theriogenology**,v.49, p. 1071- 074, 1998.

23-GOMES, G.M.; PAPA, F.O.; MACEDO, L.P.; LEÃO, K.M.; MACHADO, M.S.; ALVARENGA, M.A. Melhoria dos parâmetros espermáticos pós- descongelação com o meio MP-50 para sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **Rev Bras Reprod Anim**, v.26, p.187-189, 2002.

24- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**,v.64, p.492-504, 2005.

25- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Barueri: Manole, 2004.513 p.

26- HECKENBICHLER, S.; DEICHSEL, K.; PETERS, P.; AURICH, C. Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. **Theriogenology**, v. 75, p.849-856.

27- JASKO, D.J. Evaluation of stallion semen. **Vet. Clin. N. Am. Eq. Pract.** v.8, p.149-148, 1992.

28 - JUHÁSZ, J.; NAGY P.; KULCSÁR, M.; HUSZENICZA, GY. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a review. **ACTA VET.BRNO**, v.69, p.247-259, 2000.

29- KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**,v.63, p.1354-1365, 2005.

30-KATHIRAVAN P.; KALATHARAN J.; EDWIN M.J.; VEERAPANDIAN C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.104-109, 2008.

31- KATILA , T. Effect of the inseminate and the site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.31-38, 2005.

32- KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **The Veterinay Journal**, v.177, p. 178-191, 2008.

33- LUBERDA, Z. The role of glutathione in mammalian gametes. **Reproductive biology**,v.5, p.5-17, 2005.

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

35- MELO, C.M.; ZAHN, F.S.; MARTINS, I.; ORLANDI, C.; DELL'AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F.O. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Science**, v.27, p.171-175, 2007.

36- MICHAEL,A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; SARATSIS, P.; BOSCOS, C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**,v.68, p.204-212, 2007.

37-MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. Porto Alegre: Sulina,1987.750 p.

38- MORRIS, L.Advanced insemination techniques in mares. **Vet Clin Equine**, v.22, p.693-703, 2006.

39- MORTE, M.I.; RODRIGUES, A.M.; SOARES, D.;RODRIGUES, A. F.; GAMBOA, S.; RAMALHO-SANTOS, J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: Seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.36-47, 2008.

40-MORTIMER, S. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, p.403-439,1997.

41- NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ALONSO, M.A.; CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p.351-358, 2008.

42- NEID, D.M.; GADELLA, B.M.; COLLENBRANDER, B.; AGÜERO, A.; BROUWERS, J.F.H.M. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. **Theriogenology**,v. 58, p. 295-298, 2002.

43- NEAGU, V.R.; GARCÍA, B. M.; RODRÍGUEZ, A .M.; FERRUSOLA, C.O.; BOLAÑOS, G.; FERNÁNDEZ, L.G.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Determination of glutation peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. **Theriogenology**, v.75, p.10-16, 2011.

44- OLIVEIRA, R.A.; WOLF, C. A.; VIU, M.A.O.; GAMBARINI, M.L. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p.1148-1152, 2013.

- 45- PAPA, F. O.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; MONTEIRO, G.M. **Manual de Andrologia e Manipulação de Sêmen Equino**. Botucatu,2011. 37 p.
- 46- PICKET, B.W.; VOSS, J.L. Physiology and philosophy of breeding horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.19, p.363-373, 1999.
- 47- SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. St.Louis: Saunders Elsevier, 2007.492 p.
- 48- LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. Effects on the motility in intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**, v.13, p.368-378, 1992.
- 49- SCHOBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**,v. 68, p.745-754, 2007.
- 50- SIEME, H.; SCHÄFER, T.; STOUT, T.A.E.; KLUG, E.; WABERSKI, D. The effects of different insemination regimes on fertility mares. **Theriogenology**, v.60, p.1153-1164, 2003.
- 51- SICHERLE, C.C.; MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; RODELLO, L.; AZEVEDO, H.C. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. **Small Ruminant Research**, v. 95, p. 144-149, 2011.
- 52- SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, D. K.; VANDERWALL, P.M.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin No.09**, Fort Collins:CO, 1999. 89 p.
- 53- STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. **Theriogenology**, v.67, p.1249-1255, 2007.
- 54- THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1531-1550, 2006.
- 55- TUNCER, P.B.; BUCAK, M.N.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; SARIÖZKAN, S.; YENI, D.; EKEN, A.; AKALIN, P.P.; KINET, H.; AVDATEK, F.; FIDAN, A.F.; GÜNDOĞAN, M.The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. **Cryobiology**, v. 61, p.303-307, 2010.

56-VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p.149-179, 2002.

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