UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS NO SÊMEN DE GARANHÕES

MARCEL CAVALCANTI FARRÁS

BOTUCATU-SP
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE OXIDATIVO SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS NO SÊMEN DE GARANHÕES

MARCEL CAVALCANTI FARRÁS

Tese apresentada junto ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária para a obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior

BOTUCATU-SP
NOVEMBRO/2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Farrás, Marcel Cavalcanti.
Influência do estresse oxidativo sobre as caracteristicas espermáticas no sêmen de garanhões / Marcel Cavalcanti Farrás. - Botucatu, 2015

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: José Antônio Dell'Aqua Junior
Capes: 50504002

1. Equino. 2. Sêmen. 3. Criopreservação. 4. Preservação do sêmen. 5. Stress oxidativo.

Palavras-chave: Criopreservação; Estresse oxidativo; Fragmentação do DNA; Garanhão; Sêmen.

NOME DO AUTOR: Marcel Cavalcanti Farrás

TÍTULO: Influência do estresse oxidativo sobre as características espermáticas no sêmen de garanhões

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Antônio Dell`Aqua Junior
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^{a}. Dr^{a}. Fabiana Ferreira Souza
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

M. V. Dr. Marcio Teoro do Carmo
Membro
Médico Veterinário Autônomo

Prof. Dr. André Maciel Crespilho
Membro
Departamento de Reprodução Animal
UNISA- São Paulo

DATA DA DEFESA: 20 de novembro de 2015

Dedicatória

Aos meus pais, Ramón Farrás López e Rosangela Crippa Cavalcanti, meus maiores exemplos, que sempre me estenderam as mãos com muito amor e carinho. Este trabalho é fruto da educação e luta diária de vocês.

Aos meus queridos irmãos Bruno (Ju) e Aline, pelo incentivo, amor e companheirismo. Obrigado pelo apoio e exemplo.

Aos meus avós, tios e primos, pelo incentivo, admiração e dedicação em sermos uma família unida.

À Amanda Bonalume, um anjo-presente na minha vida, companheira inigualável, que compartilha a luta e os sonhos diários. Este trabalho é fruto do seu apoio, dedicação e parceria.

Amo todos vocês!!!

Agradecimentos

Ao amigo e ***Orientador José Antônio Dell'Aqua Junior***, por orientar e viabilizar este estudo, pelo incentivo e oportunidade proporcionada em adquirir novos conhecimentos e principalmente por abraçar minha causa, obrigado!!!

Aos membros da banca, ***Prof. Dr. André Maciel Crespilho, Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, Profª. Drª. Fabiana Ferreira Souza e Dr. Márcio Teoro do Carmo*****,** pela amizade e disponibilidade em participar deste projeto. Obrigado por compartilhar o conhecimento de vocês.

Ao ***Professor Frederico Ozanan Papa,*** pelo exemplo e disposição em ensinar, sempre.

Ao ***Professor José Pantoja,*** pelos ensinamentos e auxílio nas análises estatísticas.

Ao ***Professor Marcílio Nichi,*** pelo ensinamento, colaboração nas análises e disponibilidade, sempre. Este agradecimento se estende aos pós-graduandos que, de alguma forma, participaram das análises.

Ao ***Professor Marco Antônio Alvarenga*****,** pela oportunidade em adquirir novos conhecimentos.

Aos ***Docentes e Funcionários*** do Departamento de Reprodução Animal.

Aos ***Funcionários da Pós-Graduação*** pela atenção, paciência e disponibilidade.

Aos meus ***AMIGOS*** que sempre me incentivaram e me apoiaram nesta jornada.

Aos ***Colegas de Pós-Graduação***, pelo empenho, disponibilidade e colaboração.

Ao ***Carlos Ramires Neto***, à ***Camila Freitas Dell'Aqua***, ao ***Fábio Possebon (Cid)*** pela ajuda na obtenção de material e colaboração com o projeto de pesquisa.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C:	graus célsius
µg:	microgramas
µL:	microlitros
µm/s:	micrometros por segundo
ATP:	trifosfato de adenosina
BC:	bad cooler
BF:	bad freezer
$CaCl_2$:	cloreto de cálcio
CAT:	catalase
CIAN+:	células íntegras com translocação de fosfatidilserina
Cu^{2+}:	íon cobre
EROs:	espécies reativas de oxigênio
Fe^{2+}:	íon ferro
FITC-PSA:	Fluoroisothiocinato conjugado a *Psium sativun*
GC:	good cooler
GF:	good freezer
GPx:	glutationa peroxidase
GR:	glutationa redutase
GSH:	glutationa
H_2O_2:	peróxido de hidrogênio
I.A.:	inseminação artificial
IMP:	integridade de membrana plasmática
IP:	iodeto de propídeo
LIN:	linearidade
MDA:	malondialdeido
ml:	mililitro
MM:	Mangalarga Marchador
mM:	milimol
MP:	motilidade progressiva
MT:	motilidade total
N_2:	átomo de nitrogênio
NaCl:	cloreto de sódio
NaOH:	hidróxido de sódio
O_2^-:	radical superóxido
OH^-:	radical hidroxila
P1:	protamina 1
P2:	protamina 2
Perda MT:	% de perda de motilidade total
Prx:	peroxirredoxinas
PS:	plasma seminal
PT1:	proteína de transição 1
PT2:	proteína de transição 2
QM:	Quarto de Milha
RAP:	espermatozoides rápidos
ROS CI:	espécies reativas de oxigênio em células íntegras

SDF: índice de fragmentação do DNA
SOD: superóxido dismutase
Sptz: espermatozoide
TBA: ácido tiobarbitúrico
TBARS: teste utilizado na quantificação das espécies reativas ao TBA
TCA: ácido tricloroacético
VAP: velocidade de trajeto
VCL: velocidade curvilinear
VSL: velocidade retilínea
X-XO: xantine-xantine oxidase

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

TABELA 1: Ajuste do HTMA – IVOS – 12 para as análises seminais em equinos.....46.

TABELA 2: Mediana, mínimo e máximo das características de cinética e integridade da membrana plasmática do sêmen a fresco e pós-descongelação dos garanhões das raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha.....51.

TABELA 3: Mediana, mínimo e máximo de TBARS e do SDF do sêmen congelado, logo após descongelação e após 4 horas de incubação a 37°C dos garanhões das raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha.....53.

TABELA 4: Mediana, mínimo e máximo das características de ativação de caspase, translocação de fosfatidilserina e produção de espécies reativas de oxigênio do sêmen congelado dos garanhões das raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha .....52.

TABELA 5: Mediana, mínimo e máximo das características de cinética e integridade da membrana plasmática do sêmen a fresco e pós-descongelação dos garanhões bad freezer e good freezer.....53.

TABELA 6: Mediana, mínimo e máximo das características de ativação de caspase, translocação de fosfatidilserina e produção de espécies reativas de oxigênio do sêmen congelado dos garanhões bad freezer e good freezer.....55.

Capítulo 3

TABELA 1: Ajuste do HTMA – IVOS – 12 para as análises seminais em equinos.....70.

TABELA 2: Mediana, mínimo e máximo da motilidade total do sêmen fresco e refrigerado com plasma seminal e da perda da motilidade total para seleção dos garanhões good cooler e bad cooler .....72.

TABELA 3: Mediana, mínimo e máximo das características de cinética espermática e integridade da membrana plasmática do sêmen fresco e refrigerado com e sem plasma seminal de garanhões good cooler e bad cooler.....73.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

FIGURA 1: a) Duas células espermáticas com DNA íntegro, presença de halo pequeno; b) Célula espermática com DNA fragmentado, com presença de halo.....50.

FIGURA. 2: Boxplot com média e desvio padrão da % de perda da Motilidade Total entre os momentos pré e pós-congelação do sêmen dos garanhões bad freezer e good freezer. ab Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05) entre os grupos.....53.

FIGURA. 03. Bloxpot do efeito da incubação (37°C/4hrs) do sêmen pós-descongelação no índice de fragmentação do DNA espermático e na quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico dos garanhões bad freezer e good freezer. AB Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05) entre os momentos pré (0) e pós-incubação (4), dentro de um mesmo grupo. ab Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05) entre os grupos bad freezer e good freezer em um mesmo momento.....54.

Capítulo 3

FIGURA 1: Boxplot da quantificação de espécies reativas ao acido tiobarbitúrico do sêmen a fresco e refrigerado com e sem plasma seminal dos garanhões bad cooler e good cooler.....72.

SUMÁRIO

Capítulo 1 1
INTRODUÇÃO 2
HIPÓTESE 4
OBJETIVO 4
REVISÃO DE LITERATURA 5
1. Célula Espermática 5
2. Criopreservação Espermática 9
3. Estresse Oxidativo 13
4. Fragmentação do DNA Espermático 18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 25
Capítulo 2 41
Estresse oxidativo sobre as características espermáticas de garanhões bad e good freezer 42
Capítulo 3 63
Influência do plasma seminal na qualidade espermática do sêmen refrigerado de garanhões bad e good coolers 64
Capítulo 4 78
CONCLUSÕES 79

FARRÁS, M. C. **Influência do estresse oxidativo sobre as características espermáticas no sêmen de garanhões.** Botucatu, 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

RESUMO

Muitos garanhões não respondem de forma satisfatória frente ao processo de criopreservação sendo vários os fatores envolvidos nessa intolerância. Visando elucidar resultados superiores de alguns animais aos processos de criopreservação espermática, foram realizados dois experimentos. No experimento I, o objetivo foi avaliar a ação do estresse oxidativo e as consequências no sêmen de garanhões resistentes e sensíveis ao processo de congelação espermática, verificando também a influência do fator racial frente ao processo de congelação espermática. No experimento II, o objetivo foi avaliar a influência da presença do plasma seminal sobre a resistência espermática no sêmen refrigerado de garanhões considerados bad e good coolers. Para avaliação das amostras seminais foi realizada análise computadorizada de cinética espermática (CASA, Thorne Research – HTMA IVOS), análise e quantificação do estresse oxidativo pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), análise da fragmentação do DNA espermático (HALOMAX) e análises de translocação de fosfolipídios da membrana, índice de caspase ativada e quantificação de espécies reativas de oxigênio pela citometria de fluxo. No experimento I, não houve influência racial com relação à qualidade espermática, além disso, os garanhões bad freezer, que apresentaram maior perda de qualidade seminal após a congelação espermática, revelaram maiores níveis de estresse oxidativo e fragmentação do DNA espermático. No experimento II, os garanhões sensíveis à refrigeração apresentaram melhora da qualidade espermática ao retirarmos o plasma seminal. Já nos good coolers houve uma manutenção da qualidade espermática na presença do plasma seminal e uma diminuição da qualidade sem o plasma seminal. Além disso, observamos ao submeter as amostras ao teste-desafio, que as análises espermáticas se tornam mais confiáveis pelo fato de amplificar e evidenciar as diferenças.

Palavras-chave: Sêmen, criopreservação, estresse oxidativo, fragmentação de DNA, plasma seminal, garanhão.

FARRÁS, M. C. **Influence of oxidative stress on sperm parameters of stallion semen.** Botucatu, 2015. Thesis (PhD) – University of Veterinary Science and Animal Science, Botucatu, Paulista State University.

ABSTRACT

A significant number of stallions do not respond in a satisfactory way to the cryopreservation process and that there are many factors involved. In order to elucidate the reasons why some animals have superior results in the spermatic cryopreservation processes, two experiments were conducted. In experiment I, the goal was to evaluate the action of oxidative stress and the consequences in the semen of stallions that were resistant and susceptible to the spermatic freezing process. The influence of the racial factor to the spermatic freezing process was also verified. In experiment II, the goal was to evaluate the influence of the seminal plasma presence on spermatic resistance in cooled semen of stallions considered as bad and good coolers. To evaluate seminal samples, computer analysis of the spermatic cinetic was done (CASA, Thorne Research – HTM IVOS), oxidative stress levels were assessed by thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), sperm DNA fragmentation (HALOMAX) and analysis of the translocation of membrane phospholipids, activated caspase indices and quantification of ROS with flow cytometry were done. In experiment I, there was no influence of the breed factor in relation to the sperm quality of the analyses that were done. Furthermore, the bad freezers stallions, that showed the most loss of seminal quality after spermatic freezing, presented higher rates of oxidative stress and spermatic DNA fragmentation. In experiment II, the stallions that were considered sensitive showed improvement of the sperm quality as the SP was removed. Furthermore, in the good coolers we observed the preservation of sperm quality in the presence of SP and a quality decrease in the samples without the SP. Additionally, we also observed the importance of the test challenge for the evaluation of the sperm analysis, because when submitted to stressful situations, the differences were evident.

Keywords: Semen, cryopreservation, oxidative stress, DNA fragmentation, seminal plasma, stallion.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

A comercialização e o transporte de sêmen, tanto refrigerado como congelado, estão entre as biotécnicas mais utilizadas pelas centrais de reprodução equina no Brasil. O armazenamento do sêmen em baixas temperaturas tem como objetivo não só prolongar a viabilidade espermática, reduzindo o metabolismo celular e a formação de subprodutos indesejáveis, como também possibilitar a manutenção e utilização do material genético por um período maior e em locais onde a monta natural seria inviável (ALTHOUSE et al., 1998; MOORE et al., 2005; HOFFMANN et al., 2011).

No entanto, durante o processo de redução de temperatura, ocorre uma reorganização nos lipídeos da membrana plasmática e uma exposição da célula a situações deletérias que afetam diretamente a longevidade dos espermatozoides no trato reprodutor feminino e consequentemente a fertilidade (HOLT, 2000; GRAHAM, 2010). Nos últimos anos, muitos pesquisadores têm se dedicado ao estudo da manutenção da viabilidade espermática, na tentativa de melhorar os índices de fertilidade em diversas espécies.

Na espécie equina, por sua vez, devido aos métodos de seleção genética impostos a esta espécie, valorizando aspectos fenotípicos frente à qualidade reprodutiva, existe uma grande variabilidade individual quanto às respostas à criopreservação espermática, refletindo em garanhões com boa resistência e outros considerados intolerantes ao processo de refrigeração e/ou congelação (BRITO et al., 2007).

Vários são os fatores associados ao sucesso das biotécnicas de criopreservação espermática, a presença e/ou ausência do plasma seminal, o metabolismo celular e seus subprodutos, o estresse oxidativo, os meios diluentes utilizados, as características morfofuncionais das células espermáticas e seu comportamento frente às taxas de redução da temperatura são alguns dos fatores envolvidos.

Neste contexto, diante das várias formas de se avaliar e predizer a viabilidade espermática, este estudo teve como objetivo avaliar a influência do estresse oxidativo e da presença do plasma seminal no sêmen de garanhões resistentes e sensíveis ao processo de refrigeração e congelação espermática, buscando estabelecer possíveis causas e diferenças existentes entre esses

grupos. Para tanto, fez-se uso dos parâmetros de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, translocação de fosfolipídios, ativação de caspase, avaliação do estresse oxidativo e avaliação da fragmentação do DNA espermático.

HIPÓTESE

O estresse oxidativo e o plasma seminal influenciam na viabilidade espermática de forma distinta, dependendo da sensibilidade do garanhão ao processo de criopreservação, sendo as diferenças evidenciadas quando submetidas a testes de estresse.

OBJETIVO

Avaliar se o estresse oxidativo influencia nas características morfofuncionais do sêmen refrigerado e congelado de garanhões sensíveis ou não ao processo de criopreservação.

Avaliar a influencia do fator racial nas características morfofuncionais do sêmen congelado de garanhões sensíveis e resistentes ao processo de congelação espermática.

Avaliar se a presença e a ausência do plasma seminal influenciam de forma distinta garanhões com diferentes níveis de sensibilidade ao processo de refrigeração espermática.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Célula Espermática

Os espermatozoides são células especializadas na transferência da informação genética, com habilidades de motilidade ativa, fertilização do oócito e união dos gametas, para que haja a formação de um novo indivíduo (MORTIMER, 1997; AURICH, 2005). Para que ocorra essa união, o espermatozoide deve manter condições básicas como metabolismo para a produção de energia, motilidade progressiva, integridade das membranas plasmática e acrossomal (SQUIRES et al., 1999) e integridade do DNA para que ocorra a ligação com o gameta feminino e finalmente a fertilização (LOVE, 2005).

O gameta masculino tem origem nas células primordiais localizadas nos túbulos seminíferos, por meio de um processo conhecido como espermatogênese. Nos mamíferos, esse é um processo complexo e único que envolve mudanças fisiológicas, bioquímicas e morfológicas no qual uma espermatogônia diploide dá origem a uma série de espermatozoides haploides totalmente diferenciados, com núcleo condensado, acrossomo e flagelo (SENGER et al., 1999).

1.1 Morfologia Espermática

Didaticamente, ao estudar a célula espermática, é comum subdividi-la em cabeça e cauda ou flagelo, que por sua vez é constituído pela peça intermediária, peça principal e peça terminal, todos esses envoltos pela membrana plasmática, sendo a forma, o tamanho e a estrutura dos espermatozoides bastante variável entre as espécies (BRITO, 2007; VARNER et al., 2015).

Na cabeça estão localizados o núcleo e o acrossomo. O núcleo contém o material genético e ocupa a maior porção da cabeça do espermatozoide, preenchendo praticamente todo seu volume, na forma de DNA altamente condensado e estável, sendo este o responsável pela proteção da cromatina (D´OCCHIO et al., 2007).

O acrossomo, derivado do Complexo de Golgi, é a estrutura responsável pela penetração do espermatozoide no oócito, armazena enzimas hidrolíticas importantes para que haja a fecundação. (RAMALHO-SANTOS et al., 2002; BRITO, 2007). Ao se ligar à zona pelúcida do oócito ocorre a reação acrossomal e a liberação dessas enzimas. Esse processo, associado à hiperativação espermática, são os responsáveis pela penetração da zona pelúcida e consequente fertilização do oócito (HONDA et al., 2002).

Na porção distal da célula espermática encontra-se a cauda, responsável pelo armazenamento de energia e pela movimentação do espermatozoide, sendo subdividida em quatro regiões: o colo ou peça de conexão, a peça intermediária, a peça principal e a peça terminal (BARTH e OKO, 1989; VARNER e JOHNSON, 2007). Na peça intermediária estão localizadas as mitocôndrias, organelas responsáveis pela produção de adenosina trifosfato (ATP) e consequentemente pelos batimentos flagelares (COSSON, 1996).

A membrana plasmática, que envolve todas essas estruturas, é constituída por uma bicamada lipídica, contendo fosfolipídios, colesterol e glicolipídeos e diferentes tipos de proteínas organizados em modelo de mosaico fluído. Durante a criopreservação do sêmen, ocorre um rearranjo nessa estrutura e a relação entre seus componentes estruturais são os principais envolvidos na integridade celular durante o processo (ALBERTS et al., 1997). Devido sua importância para a proteção do espermatozoide e manutenção de suas funções, a sua integridade também é utilizada para avaliar a viabilidade dos espermatozoides (JANUSKAUSKAS et al., 2000; GARNER et al., 1997).

1.2. Núcleo

No início da espermatogênese, o DNA esta associado às histonas assim como na configuração de uma célula somática qualquer (D'OCCHIO et al, 2007). Posteriormente, a forma e tamanho do núcleo e o grau de compactação da cromatina mudam drasticamente (DADOUNE, 2003).

Concomitante às alterações visíveis na organização da cromatina dos espermatozoides ocorre a substituição das nucleoproteínas, na qual as histonas são removidas do DNA de espermatócitos e espermátides iniciais,

sendo substituídas por proteínas de transição, que por sua vez são substituídas pelas protaminas (STEGER, 1999; KIERSZENBAUM, 2001; ZHAO et al., 2001). Estas interagem com o DNA de forma única, resultando no seu enrolamento em subunidades extremamente compactas em forma de solenoide, que são as responsáveis pela condensação final e estabilização da cromatina dos espermatozoides (BALHORN et al., 1999; D'OCCHIO et al., 2007).

O nucleossomo é composto por DNA envolto em um octâmero de histonas (NOLL 1974). Cada nucleossomo está ligado à fita de DNA através de um "DNA-linker", adquirindo a forma de um colar de contas (WOLFFE 2001). Com o uso da microscopia eletrônica, foi possível observar que a organização da cromatina do nucleossomo em espermátides iniciais desaparece e é substituída por fibras lisas. A agregação dessas fibras dá origem a fibras maiores, que se aglutinam em uma densa massa homogênea resultante da interação do DNA espermático com as protaminas (DADOUNE, 2003). Dessa forma a cromatina dos espermatozóides é organizada de forma diferente das células somáticas (HAAF e WARD, 1995; EVENSON et al, 2002).

1.3. Nucleoproteínas

As histonas representam aproximadamente 20% das proteínas nucleares em espermatozoides humanos (DADOUNE, 2003) e podem ser divididas em três categorias (MEISTRICH et al, 1989). As histonas somáticas: encontradas em células somáticas e nas células espermatogênicas do testículo; variações de "células germinativas" presentes em células somáticas, e pouco encontradas em células espermáticas (MEISTRICH et al, 1989); e as histonas específicas dos testículos, encontradas somente em células espermáticas e testiculares (MEISTRICH et al, 1989).

A acetilização da porção terminal da cauda das histonas H4 reduz sua afinidade pela fita de DNA (McCARREY 1998), e consequentemente sua rigidez, tornando possível a interação com outras proteínas, o que resultará na substituição das histonas pelas proteínas de transição (MEISTRICH et al, 1992).

As proteínas de transição são as mais encontradas nas espermátides durante o período de substituição das histonas pelas protaminas (MEISTRICH

et al, 1989). Durante esta fase, pode-se dizer que ocorrem três importantes eventos: a reorganização da cromatina no nucleossomo, ordenando-as em fibras lisas; o inicio da condensação da cromatina; e o fim da fase de transcrição. Sugerindo assim que as proteínas de transição estão envolvidas em pelo menos um destes processos. (DADOUNE 2003).

Nas espécies mamíferas, encontram-se vários tipos de proteínas de transição, porém as proteínas denominadas 1 e 2 (PT1 e PT2) são comuns à todas as espécies. Acredita-se que estas realizam a função de alinhamento longitudinal do DNA (DADOUNE 2003), e que também estão ativamente envolvidas no processo de condensação nuclear, que transforma a cromatina somática na cromatina fibrilar dos espermatozoides maduros (LÉVESQUE et al, 1998).

A PT1 tem a capacidade de desestabilizar e relaxar a fita de DNA, reduzindo sua interação com o nucleossomo (LÉVESQUE et al, 1998). Além disso, está envolvida no processo de reparação de quebras na fita do DNA (CARON et al, 2001). Já a PT2 tem maior participação na estabilização e condensação da cromatina, antes mesmo da atuação das protaminas (LÉVESQUE et al, 1998).

Vários estudos têm demonstrado o envolvimento de dois tipos diferentes de protaminas na compactação dos espermatozoides, a P1, encontrada em todas as espécies mamíferas, e a P2, encontrada somente em algumas espécies (BALHORN et al, 1999).

Devido as diferentes proporções entre P1 e P2 encontradas nas diferentes espécies, existe uma dificuldade de se estabelecer como estas duas protaminas participam no processo de compactação do DNA espermático. Porém sabe-se também que há uma relação constante entre a soma das protaminas associadas à fita de DNA. Podendo então, ser estabelecido um padrão sobre sua quantidade total e consequentemente ao comprimento de fita de DNA que está associado a elas (BALHORN et al, 1999).

Através da microscopia eletrônica, foi observado pela primeira vez que as protaminas ligadas à fita de DNA são as responsáveis pela organização da cromatina em forma de rosca, dando origem a uma estrutura única extremamente compactada e resistente ao processo de desnaturação (D’OCCHIO et al, 2007), demonstrando assim a importância do papel das

protaminas e do seu correto funcionamento com relação à fertilidade masculina e ao desenvolvimento embrionário. Dessa forma, por alguma falha no mecanismo de substituição das nucleoproteínas, pode não ocorrer à correta substituição dessas histonas, resultando na formação de uma estrutura inadequada com uma cromatina instável e susceptivel a danos (EVENSON et al, 1999).

2. Criopreservação Espermática

Há alguns anos várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de prolongar a longevidade espermática através da criopreservação do sêmen equino, seja pela refrigeração ou congelação, e com isso melhorar as taxas de fertilidade. Muitas dessas pesquisas têm como objetivo desenvolver diluidores, aditivos, curvas e protocolos que garantam a motilidade e integridade do sêmen equino, ou pelo menos minimizem os danos intrínsecos ao processo de exposição a baixas temperaturas e com isso índices de fertilidade melhores e menos variáveis.

A partir da década de 90, houve um aumento considerável na utilização do sêmen equino refrigerado e congelado, principalmente devido à aceitação de grande parte das associações de criadores de cavalos. O uso destas biotécnicas facilita muito o manejo reprodutivo nos haras, já que não há necessidade da presença da égua e do garanhão no mesmo local (SQUIRES et al, 1998). O fato de se transportar o sêmen até as éguas, ao invés de transportá-las até o garanhão oferece inúmeras vantagens, como a eliminação de gastos com transporte, a diminuição do estresse animal, a diminuição dos riscos impostos aos potros e as próprias matrizes em relação a possíveis acidentes e de adquirir doenças, como resultado da exposição a patógenos em seu novo ambiente, além, destas propriedades serem, na grande maioria, distantes e dispenderem altos custos com a hospedagem dos animais (BRINSKO e VARNER, 1992).

2.1. Sêmen Refrigerado

O sucesso da inseminação artificial nos equinos, assim como em outras espécies, depende da manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen durante o armazenamento (IJAZ E DUCHARME, 1995). Além disso, quanto maior o tempo no qual se mantém o potencial fertilizante do sêmen refrigerado, maior flexibilidade terá o médico veterinário para coletar e enviar o sêmen aos haras em que as éguas se encontram (PICKETT, 1995), resultando em maior êxito da técnica (BATELLIER et al., 2001).

Diluidores adequados, taxa de refrigeração lenta, temperatura de manutenção adequada, a minimização dos danos na membrana plasmática e o bloqueio da capacitação prematura do espermatozoide são alguns dos fatores diretamente ligados ao sucesso da preservação espermática pelo processo de refrigeração (LOOMIS, 1992). Entretanto, sabe-se que a taxa de fertilidade do sêmen refrigerado diminui à medida que aumenta o tempo de armazenamento (PICKETT, 1995).

O intervalo de temperatura entre 4 e 5°C é considerado como o ideal para a manutenção das células espermáticas (SQUIRES et al 1999), para que se chegue a estas temperaturas, é recomendado que o sêmen seja refrigerado rapidamente da temperatura de 35°C até 19°C, porém após esta etapa deve-se diminuir a taxa de refrigeração a -0,05°C/min a fim de se evitar o “cold shock” (choque frio) devido a alta sensibilidade do espermatozoide equino ao atingir temperaturas próximas a 8 e 9°C (KATILA et al, 1997). Esse processo se caracteriza por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou retrógrado), perda rápida de motilidade, danos ao acrossomo e membrana plasmática, redução de metabolismo e perda de componentes intracelulares (AMANN e GRAHAM, 1992).

Todos esses cuidados são necessários, pois a exposição do sêmen desprotegido a baixas temperaturas resulta em desarranjos morfológicos e bioquímicos que tornam os espermatozoides irreversivelmente imóveis e inférteis (WATSON, 1981) e quanto mais tempo o potencial fertilizante do sêmen refrigerado possa ser estendido, mais fácil será uso do sêmen transportado juntamente com o sucesso da técnica (BATELLIER, et al., 2001).

A conservação do sêmen em temperaturas superiores (15 a 20°C) também tem sido utilizada, sendo que nestas temperaturas o sêmen não deve

ser armazenado por um período maior que 24 horas, o que resulta na diminuição das taxas de fertilidade (SQUIRES et al, 1999). No Brasil, a refrigeração do sêmen a temperatura entre 15 e 18°C é frequentemente utilizada, por necessitar de sistemas de armazenamento mais simples (ALVARENGA e CARMO, 2007).

Apesar da grande difusão em relação ao uso do sêmen equino refrigerado, este ainda apresenta algumas limitações, sabe-se que há uma variação considerável nas taxas de fertilidade, que na medida em que o tempo de armazenamento aumenta, a fertilidade do sêmen diminui, e que para conseguir bons índices de fertilidade o sêmen não deve ser refrigerado por um período superior a 24 horas (PICKETT, 1995). Dentre os fatores que podem afetar essas taxas podemos ressaltar a fertilidade intrínseca do garanhão e da égua, a composição do diluente adicionado ao sêmen, a curva de refrigeração, a temperatura de armazenamento do sêmen diluído, a dose inseminante (quantidade total de espermatozoides móveis), a relação entre a inseminação e a proximidade da ovulação e o tempo de armazenamento in vitro. (PICKETT, 1995).

2.2. Sêmen Congelado

Na ultima década, houve um aumento considerável nas pesquisas sobre protocolos para congelação de sêmen equino, principalmente devido à aceitação de grande parte das associações de criadores de cavalos (ALVARENGA et al 2005), buscando sempre garantir sua qualidade quando submetido ao processo de congelação e descongelação (HOLT, 2000b), visando sempre que os índices de fertilidade melhorem e sejam menos variáveis.

Dentre as vantagens do uso desta biotécnica, pode-se destacar a potencialização do uso de reprodutores em situações em que a monta natural ou inseminação artificial (I.A.) com sêmen fresco ou refrigerado não seria possível, seja pela distância, como no caso do comércio internacional de sêmen, ou pela participação em atividades esportivas, e até mesmo quando este vem a óbito. Dessa forma podemos continuar utilizando e disseminando seu potencial genético (GRAHAM, 1996), não somente por um período maior, como também por uma área mais extensa.

Apesar de nosso país ser um dos que mais se utilizam das biotécnicas da reprodução para gerar produtos (VIANA & CAMARGO, 2007), os resultados obtidos, com o uso do sêmen congelado, ainda são muito variáveis. Essa variação se deve, não só ao processo biotecnológico, mas também às características e comportamento individual, do ejaculado de cada garanhão exposto ao processo de congelação, que muitas vezes não resistem de forma satisfatória para que se obtenha um potencial fertilizante adequado (BRINSKO et al., 2000).

Outro fator importante é a seleção genética no qual os equídeos foram submetidos ao longo dos anos, valorizando-se principalmente alguns padrões raciais e de desempenho atlético (AMANN & GRAHAM, 1992) e raramente visando aspectos reprodutivos, resultando assim, na seleção de um número significativo de reprodutores com baixo desempenho reprodutivo (LOOMIS, 2006).

Arruda et al. (2003) verificaram que além haver diferenças entre os crioprotetores e diluentes, também existe a influência do garanhão e uma interação entre esses elementos, sugerindo que, antes de se adotar um protocolo de congelação de sêmen, deve ser feito uma série de testes afim de se descobrir o protocolo mais favorável àquele individuo, obtendo-se o melhor resultado possível. Amman e Pickett (1987) destacam que, além dos fatores raciais, podem ser observadas grandes diferenças individuais dentro de uma mesma raça.

Estudando as consequências do processo de congelação no sêmen de garanhões, Maziero (2010) observou que os animais que obtiveram ejaculados com alta congelabilidade apresentaram uma maior taxa de concepção (70,6 vs 44,5%) com relação ao grupo de baixa congelabilidade, apresentando uma chance de se obter uma prenhez cerca de quase três vezes maior.

No Brasil Alvarenga et al. (1996, 2003 e 2005) observaram que garanhões da raça Mangalarga e Mangalarga Marchador, por fatores ainda não determinados, são mais susceptíveis ao processo de congelação espermática quando comparado a outras raças. Alvarenga et al. (1996) demostraram que animais de raças de salto (Hannoveriano, Holstainer e Trackner) apresentaram 80% de indivíduos tolerantes ao processo em relação às raças Mangalarga e Mangalarga Marchador (15%). Vidament et al. (1997) relataram que 20% dos

garanhões apresentam bons resultados frente à congelação, 60% apresentam índices aceitáveis e 20% não respondem bem e congelam mal, justificando a menor taxa de fertilidade do sêmen congelado frente ao sêmen fresco ou refrigerado (SAMPER & MORRIS, 1998; WATSON, 2000).

A exposição do sêmen desprotegido a baixas temperaturas resulta em desarranjos morfológicos e bioquímicos que tornam os espermatozoides irreversivelmente imóveis e inférteis (WATSON, 1981), resultando em menores índices de fertilidade (AURICH, 2008). Durante os processos de redução de temperatura, tanto na refrigeração quanto na congelação, ocorre reorganizações nos lipídeos da membrana plasmática, diminuindo a longevidade dos espermatozoides (HOLT, 2000). Dentre os fatores que diminuem esta fertilidade existem causas que afetam a proporção de células espermáticas vivas (choque de temperatura, curva de resfriamento, estresse osmótico e composição de diluentes), e causas que afetam a funcionalidade dos espermatozoides vivos (estabilidade de membrana, estresse oxidativo, integridade de membrana, integridade da estrutura do DNA) (WATSON, 2000).

Diante desses acontecimentos, o uso correto dos crioprotetores, da taxa de refrigeração, de congelação e de descongelação são fatores importantíssimos para o sucesso desta biotécnica e diminuição da variabilidade das taxas de prenhez (METCALF, 2007).

3. Estresse Oxidativo

Seja pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou por deficiência na função dos antioxidantes, o desequilíbrio entre sua produção e neutralização caracteriza o estresse oxidativo (DIPLOCK, 1994).

Apesar de o estresse oxidativo estar ligada a eventos fisiológicos como a capacitação espermática, reação acrossomal, hiperativação e fusão do espermatozoide com o oócito (BAUMBER et. al., 2000; GADELLA et. al., 2001), o aumento excessivo da concentração de EROs, induz a peroxidação lipídica e proteica da membrana plasmática, o que compromete a integridade espermática, traz consequências e danos à fita de DNA, resultando, assim, em efeitos indesejados na função espermática (MORTE et.al., 2008).

Em equinos, estudos demonstraram que as EROs atuam promovendo a peroxidação lipídica, além de estar associada com a diminuição da fertilidade (BAUMBER et al, 2000; BALL e VO, 2002), visto que a peroxidação altera a fluidez da membrana plasmática e compromete a fusão das membranas espermáticas, durante a reação acrossomal (BALL, 2011).

Ortega-Ferrusola et. al. (2009) observaram uma correlação negativa da lipoperoxidação com a viabilidade espermática ($r= -0,789$, $p<0,001$), e com o potencial mitocondrial ($r=-0,689$, $p<0,001$), sugerindo que a lipoperoxidação influencia diretamente na crio-resistência do sêmen de alguns garanhões, e também, entre ejaculados dos mesmos.

3.1. Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas e/ou átomos derivados do metabolismo oxidativo, apresentam alta instabilidade devido a presença de elétrons desemparelhados, o que faz com que sejam extremamente reativas e atuem tanto como agente oxidante (sequestrando elétrons), ou como agente redutor (doando elétrons) (HALLIWELL 1991; MARLIN et al., 2002; AGARWAL et al., 2005; MAKKER et al. 2009).

A principal fonte de produção de EROs no sêmen dos mamíferos esta relacionada à cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias (BALL et al., 2001; KOPPERS et al., 2008; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009; PEÑA et al., 2011), sendo esta a responsável pela fosforilação oxidativa e produção de maior parte da energia fornecida às células (BLIER et al., 2001). À partir de reações oxido-redução, uma molécula de oxigênio é reduzida e origina uma molécula de água e energia na forma de ATP. Essa reação pode gerar intermediários reativos acarretando na formação das EROs (DOWNLING e SIMMONS, 2009; MAIA, M. e BICUDO, S., 2009).

Dentre os intermediários reativos originados do metabolismo energético destaca-se o radical superóxido (O2-), o radical hidroxila (OH-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como os principais envolvidos no estresse oxidativo das células espermáticas (HALLIWELL, 1989; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; BAUMBER et al., 2000; BILODEAU et al, 2001; BURNAUGH et al., 2007; BURNAUGH et al., 2010).

Radical superóxido (O2-)

O ânion superóxido é um radical livre, formado a partir de uma molécula de oxigênio pela adição de um elétron. Considerado um subproduto da cadeia respiratória, é pouco reativo e não é capaz de transpassar as membranas lipídicas, atuando apenas no sítio de produção (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001; ANDRADE et al., 2010).

Como consequência da redução da molécula de oxigênio, o O2-, uma das primeiras EROs formadas, ou reage de forma rápida ou é catalisada pela superóxido dismutase (SOD) dando origem ao peróxido de hidrogênio (H2O2) (BALL et al. 2001).

Peróxido de hidrogênio (H2O2)

O peróxido de hidrogênio, por sua vez, não é um radical livre e sim um metabólito intermediário do oxigênio, que sob a ação da catalisação de íons Fe2+ ou Cu2+, é transformado pela reação Fenton e resulta na formação do radical hidroxila (OH-). É considerado altamente reativo e deletério, apresenta tempo de meia-vida longo e é capaz de transpassar membranas biológicas (BALL et al., 2001; BURNAUGH et al., 2007; OTT et al., 2007; PEÑA et al., 2011; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001; MAIA, 2006).

Radical hidroxila (OH-)

Considerado o mais reativo das EROs, o radical hidroxila (OH-), é produzido a partir da reação de Fenton, catalisada por íons Fe2+ ou Cu2+ (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001; MAIA, 2006;). É capaz de desencadear a reação de peroxidação lipídica da membrana plasmática pela retirada de um átomo de hidrogênio dos ácido-graxos poli-insaturados danificando-a e comprometendo sua função. Além disso, quando produzida próximo à molécula de DNA causa danos estruturais e funcionais à cromatina (MAIA e BICUDO, 2009; SILVA e GUERRA, 2010; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NORDBERG e ARNÉR, 2001).

Por apresentar um alto teor de ácidos-graxos poli-insaturados, essenciais para que a membrana plasmática dos espermatozoides apresente a permeabilidade necessária para realizar suas funções (motilidade ativa, integridade estrutural, fusão com o oócito), os espermatozoides se tornam altamente susceptíveis aos danos causados pelo estresse oxidativo, como a diminuição da motilidade, lesões na fita de DNA e a diminuição da capacidade fertilizante do espermatozoide, visto que os lipídios estão entre os principais acometidos pelas EROs (AITKEN & KRAUSZ 2001, MAKKER et al. 2009, AITKEN & BAKER, 2004, BAUMBER et. al. 2000, IRVINE et al., 2000; VALENÇA e GUERRA, 2007; SILVA e GUERRA, 2010).

Ao reagir com as EROS, as duplas ligações presentes nos ácidos graxos poli-insaturados da membrana plasmática sofrem uma reação em cadeia de peroxidação lipídica, levando a diminuição da permeabilidade dessa membrana e, consequentemente, à perda da função espermática (AITKEN e KRAUSZ, 2001). Baumber et al (2000) averiguaram que a motilidade espermática pode decair antes mesmo de se detectar a lipoperoxidação, sugerindo que as EROs influenciam a cinética espermática independente da peroxidação lipídica, muito provavelmente pela alteração da função mitocondrial (BAUMBER et al., 2003).

No processo de criopreservação ocorrem danos na membrana plasmática dos espermatozoides, e na presença de células criolesadas, não viáveis e/ou com defeitos morfológicos, como gota citoplasmática proximal ou defeitos na peça intermediária, há um aumento na formação de EROs e consequentemente do estresse oxidativo (BALL et al., 2001), que por ser considerado a principal causa de fragmentação do DNA espermático (SAKKAS e ALVAREZ, 2010), eleva os níveis basais de danos no DNA, que podem atingir até 50% após 6 horas de incubação a 37°C (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et. al, 2007), comprometendo de forma significativa a fertilidade (TESARIK et al., 2004).

Ball (2008) observou que outra importante alteração derivada do processo de criopreservação são os efeitos deletérios causados às mitocôndrias, evidenciado pela alta prevalência de edema de peça intermediária no momento pós-descongelação, o que pode levar a um metabolismo oxidativo anormal, a formação excessiva de EROs e a indução da apoptose.

3.2. Antioxidantes

Como antioxidantes, podemos considerar qualquer substância que retarde, previna, regule, iniba e/ou elimine, de forma direta ou indireta, os danos ou agentes oxidativos (HALLIWELL 2007; KHLÉBNIKOV et al., 2007). Estes podem ser subdivididos em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

No grupo dos antioxidantes enzimáticos, ou naturais, destaca-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutationa (GSH), glutationa redutase (GR) e glutationa peroxidase (GPx). Já os antioxidantes não enzimáticos ou sintéticos são adquiridos pela dieta, apresentam baixo peso molecular e incluem o ácido ascórbico (Vitamina C), ácido α-lipóico, o tocoferol (Vitamina E), ubiquononas, taurinas, caroteno, betacaroteno, selênio e zinco. (MAIA, 2006; FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Existem duas características, importantes no dano oxidativo, relevantes para a etiologia da infertilidade masculina, primeiro, a ocorrência da catalisação da cascata da peroxidação por metais de transição, como ferro e cobre, encontrados no plasma seminal em quantidade suficiente para catalisar esta reação. A segunda é a presença de antioxidantes nas secreções do trato reprodutivo, incluindo enzimas protetoras secretadas no espaço extracelular, como, por exemplo, a GPx e a SOD, produzidos na cabeça e cauda do epidídimo, respectivamente (VERNET et al., 1996 e 1997), justificando o porquê de alguns homens considerados inférteis apresentarem uma atividade antioxidante deficitária nos ejaculados, resultando em uma correlação inversa com a fertilidade (SMITH et al, 1996).

Por apresentarem uma capacidade limitada de resistir ao estresse oxidativo (AITKEN,1994; NICHI et al., 2006), os espermatozoides se tornam dependentes de substâncias antioxidantes, seja presente no plasma seminal (BAUMBER et al 2005) e/ou nos diluentes, para que se minimize os efeitos deletérios das EROs (CRESPILHO et al, 2014; BAUMBER et al., 2002 e 2003; AITKEN & CLARKSON, 1988).

Embora o plasma seminal dos equinos apresente alta atividade neutralizadora das EROs, sua concentração e mecanismo de ação é altamente influenciada pela diluição e/ou remoção do plasma seminal durante a

criopreservação (BALL et al., 2001; BALL, 2008), podendo intensificar a vulnerabilidade dos espermatozoides devido à perda de substâncias antioxidantes presente no plasma seminal (BAUMBER et al., 2005).

Durante o metabolismo oxidativo, a lipoperoxidação da membrana plasmática gera subprodutos especialmente tóxicos como o radical peroxil, o malondialdeido (MDA) e o 4-hidroxinonenol (BAUMBER et al., 2000 e 2003). Estes, se não inativados e regulados à concentração fisiológica adequada, interferem diretamente na motilidade, viabilidade celular e fertilidade espermática (AGARWAL et al., 2003; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; SILVA e GUERRA, 2010).

O MDA ($CH_2(CHO)_2$), subproduto da decomposição lipídica da membrana plasmática, é um composto orgânico frequentemente utilizado como marcador do estresse oxidativo podendo ser mensurado pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), avaliando-se assim a peroxidação lipídica não só em células espermáticas, mas também em diversos tecidos e sistemas. (BONNES-TAOUREL et al., 1992; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2010; CRESPILHO et al 2014.; NICHI et al., 2006).

4. Fragmentação do DNA Espermático

A integridade do DNA espermático é essencial para a correta transmissão da informação genética. Por apresentar uma estrutura altamente compacta e complexa, qualquer anormalidade na cromatina ou dano no DNA pode influenciar diretamente na fertilidade masculina (AGARWAL e SAID, 2003).

Entre os parâmetros avaliados para se determinar as características de uma amostra de sêmen, a fragmentação do DNA espermático vem despertando grande interesse (GOSÁLVEZ et al, 2006). Em humanos, o estudo da fragmentação do DNA espermático tem ajudado a entender as causas de infertilidade em espermogramas considerados normais (SERGERIE et al, 2005). Além disso, foi relatado que a fertilidade *in vivo* diminui progressivamente quando se identifica mais de 30% dos espermatozoides com danos no DNA, existindo uma correlação negativa entre fragmentação do DNA

e fertilidade (LOVE, 2005; MORRELL et al., 2008).

O processo de dano ou fragmentação do DNA espermático tem origem multifatorial, e apesar de ainda não estar bem definida, já se sabe que alguns acontecimentos são determinantes para que ocorra a fragmentação do DNA espermático (GOSÁLVEZ et al, 2006). Erros durante a compactação da cromatina, no processo de substituição de histonas por protaminas (GORCZYCA et al, 1993; SAILER et al, 1995; GOSÁLVEZ et al, 2006; DE AMBROGI et al, 2006), a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) (KODAMA et al, 1997; SUN et al, 1997; AITKEN et al, 1998; LOPES et al, 1998; IRVINE et al, 2000; AITKEN e KRAUSZ, 2001; MOUSTAFA et al, 2004; GOSÁLVEZ et al, 2006; DE AMBROGI et al, 2006), e a ocorrência de apoptose celular (SAKKAS et al, 1999 e 2002; GOSÁLVEZ et al, 2006) são alguns dos fatores que influenciam na fragmentação do DNA espermático.

No início da espermatogênese, o DNA está associado às histonas em uma configuração clássica assim como a de outra célula somática. Porém, com o decorrer da espermatogênese há uma substituição dessas histonas por protaminas. Este evento ocorre antes da saída do espermatozoide dos testículos. Já no epidídimo ocorre a formação de pontes de dissulfeto intra e intermoleculares nas protaminas, resultando em uma compactação e uma maior resistência do DNA à desnaturação. Dessa forma, a ocorrência de algumas falhas nesse procedimento pode alterar as características das nucleoproteínas, resultando em uma cromatina susceptível ao processo de desnaturação (D'OCCHIO et al, 2007).

Em um estudo de Gosalvez et al (2011), comparando a dinâmica da fragmentação do DNA espermático em 11 espécies de mamíferos, foi observado que os espermatozoides de espécies que continham as protaminas P1 e P2 apresentaram valores médios de fragmentação do DNA espermático (SDF) significativamente mais elevados do que aquelas apenas com a P1 (19,26±1% e 11,49±2% , respectivamente). Além disso, foi possível, através do sequenciamento de aminoácidos presentes na P1 e das diferenças apresentadas pelas espécies, construir uma árvore filogenética que justifica as altas taxas de fragmentação apresentadas por algumas espécies quando comparadas a outras. Esta análise parece indicar que as respostas da fragmentação do DNA são semelhantes nas espécies que compartilham

grande parte de sua história evolutiva (GOSALVEZ et al, 2011).

Em humanos tem-se atribuído alguns casos de infertilidade à diminuição no nível de protamina P2, causado pela persistência de histonas ou por alguma deficiência nos precursores da P2. A presença de moléculas de cisteína nas P1 também foi um fator correlacionado à estrutura do DNA espermático, por estabilizar a composição da cromatina e auxiliar na manutenção das pontes de dissulfeto (DE YEBRA et al, 1998).

Em outro estudo, avaliando a relação de protaminas 1 e 2 (P1/P2), GARCÍA-PEIRÓ et al (2011) verificaram que a taxa de P1/P2 obteve correlação com o Índice de Fragmentação do DNA Espermático (SDF) (r=0,424; p=0,015) e com o Índice de Fragmentação do DNA Espermático ao Longo do Tempo (rSDFI) (r=0,525; p=0,002) no momento após a descongelação, demonstrando, assim os indivíduos mais susceptíveis ao dano da cromatina espermática.

O aumento da concentração de EROs tem influência direta na peroxidação lipídica e proteica das membranas, plasmática e acrossomal, dos espermatozoides, o que compromete sua integridade e leva à desnaturação da fita de DNA (MORTE et.al., 2008). A perda da proporção entre a produção e proteção das EROs pode desencadear efeitos indesejados na função espermática, sendo que o controle fisiológico da sua produção está ligado com eventos como a capacitação espermática, reação acrossomal, hiperativação e fusão do espermatozoide com o oócito (BAUMBER et al., 2000; GADELLA et. al., 2001).

No plasma seminal existem enzimas e moléculas com características antioxidantes, como a albumina, taurina, piruvato, lactato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotionina, que auxiliam significativamente na proteção do espermatozoide (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1992; DE AMBROGI et al, 2006; BAUMBER et al., 2000; AITKEN 2004). Estas têm por função controlar a concentração de EROs, mantendo-as a níveis fisiológicos, prevenindo assim a ocorrência de danos celulares. Logo, todo mecanismo que diminua a concentração destes antioxidantes, acarreta em um aumento das EROs, do estresse oxidativo e um consequente aumento no dano celular (BAUMBER et al., 2000; AITKEN 2004).

Baumber et al (2002 e 2003) comprovaram que a incubação *in vitro* da xanthine-xanthine oxidase (X-XO) resultou em um aumento dose–dependente

na fragmentação do DNA espermático de equinos, que, por sua vez, foi neutralizada com a adição de CAT, mas não com a adição de SOD e GPx, demonstrando certa eficácia do uso de substâncias antioxidantes na redução do estresse oxidativo e na preservação da integridade do DNA. Sergerie et al (2005) também demonstraram que a exposição artificial a EROs causou um aumento do dano no DNA espermático. Já AITKEN e CLARKSON (1988) observaram um efeito neutralizador do estresse oxidativo pela adição de enzimas e antioxidantes no sêmen.

Em estudo com sêmen humano exposto a crescentes graus de estresse oxidativo, verificou-se que quando submetidos a baixos níveis, a fragmentação do DNA espermático foi significantemente baixa, e as taxas de fusão espermatozoide–oócito foram aumentadas (AITKEN 1999). Já com o aumento do estresse oxidativo, o mesmo autor verificou que o grau de dano no DNA aumentou significantemente e ainda nos níveis mais altos de estresse oxidativo, houve altíssimas taxas de fragmentação de DNA, juntamente com a diminuição da motilidade e capacidade de fusão com o oócitos.

Estes resultados estão de acordo com o estudo de Ahmadi e Ng (1999), que avaliaram a capacidade fertilizante de espermatozoides de “hamsters” com DNA danificado, pela exposição a diferentes graus de radiação gama, demonstrando assim, que os espermatozoides com DNA danificado possuem a capacidade de fertilizar o oócitos, porém o desenvolvimento embrionário se torna comprometido.

A ocorrência de apoptose celular é outro fator que parece ter influência sob a fragmentação do DNA espermático. A “Fas” é uma proteína de membrana, que pertence ao grupo de fator de necrose tumoral, e que tem como função atuar como receptor do fator de crescimento e como mediador da apoptose celular (SUDA et al, 1993; KRAMMER et al, 1994; SCHULZE-OSTHOFF et al, 1994).

A apoptose nos espermatozoides, assim como nas células somáticas, ocorre como forma de eliminar células germinativas defeituosas (SAKKAS et al, 1999), assim, durante o processo da espermatogênese o mecanismo de verificação da célula germinativa, regido pelas células de Sertoli, é responsável pela indução de apoptose em 50% a 60% de todas as células germinativas que expressarem os marcadores apoptóticos “Fas”, resultando na sua fagocitose e

consequente eliminação (BANERJEE et al, 1995). No entanto, esse mecanismo pode não funcionar de forma eficiente, deixando que um percentual variável de células com defeito continue o processo de remodelação durante a espermiogênese, estando presente mais tarde no ejaculado. Quanto a falha do mecanismo de rastreamento, os resultados de um estudo de Burrello et al. (2003), sugerem que a qualidade do DNA e o remodelamento da célula espermática são eventos independentes, ou seja, a célula pode ter o núcleo corrompido e ainda sim resultar em um espermatozoide morfologicamente normal. Logo, o fato de uma porcentagem variável de espermatozoides expressar marcadores apoptóticos, indica que este fenômeno poderia ser utilizado para selecionar os espermatozoides em amostras de sêmen (TESARIK et al, 1998).

Por muitos anos se pensou que a mortalidade embrionária nas espécies mamíferas fosse resultante de fatores relacionados com a infertilidade feminina (D'OCCHIO et al, 2007). Atualmente têm-se importantes evidências que correlacionam à integridade da cromatina espermática, não só com a fertilização, mas também com o desenvolvimento embrionário (MORRIS et al, 2002; WARD et al, 2000; D'OCCHIO et al, 2007).

A avaliação da estrutura da cromatina espermática tem mostrado uma boa correlação com a fertilidade em diversas espécies como: touros (EVENSON et al, 1980; BALLACHEY et al, 1988; KARABINUS et al, 1990), humanos (EVENSON et al, 1999), ratos (EVENSON et.al., 1980) e garanhões (LOVE e KENNEY, 1998; FARRÁS, 2012), onde espermatozoides de indivíduos com baixa fertilidade apresentaram uma maior desnaturação da cromatina que os espermatozoides de machos de alta fertilidade (GILLAN et.al., 2005; FARRÁS, 2012).

Em estudo com a espécie equina, Love (2005) demonstrou que a qualidade da cromatina pode decair mesmo com a manutenção de bons padrões de motilidade espermática. Ahmadi e Ng (1999) perceberam que ejaculados contendo espermatozoides com DNA comprometido, parecem ter a mesma capacidade de fertilizar oócitos quanto espermatozoides normais.

Em estudo com 89 casais humanos submetidos aos tratamentos reprodutivos de fertilização *in vitro* (FIV) e Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), Larson-Cook et al (2003) verificaram que não houve

gestação quando os índices de fragmentação foram maiores que 27%. Já Bungum et al (2004) obtiveram melhores resultados na ICSI em relação à FIV utilizando o mesmo índice de fragmentação. Donelly et al (2001) comparando sêmen fresco e congelado do mesmo ejaculado de homens considerados férteis e inférteis, relataram que no grupo de homens férteis, a estrutura do DNA não foi afetada pelo processo de criopreservação, totalmente oposto do grupo de homens inférteis, na qual teve um grau de dano de DNA significativo e relacionado ao processo de congelação.

4.1. Avaliação da Cromatina Espermática

A biologia molecular voltada à área da reprodução tem resultado em inúmeras técnicas para a avaliação da qualidade da cromatina espermática e para a determinação da fragmentação do DNA espermático (SERGERIE et al, 2005). Atualmente, existem basicamente duas estratégias para se estudar a fragmentação do DNA em amostras de sêmen, a primeira inclui as tecnologias que medem a capacidade da cromatina e do DNA em sofrer desnaturação diante de vários tratamentos (técnicas: SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay); COMETA (Single-cell gel electrophoresis-SCGE); e o SCDtest (Teste de Dispersão da Cromatina Espermática)). A segunda estratégia inclui as técnicas que se utiliza de marcadores, incorporando moléculas nos locais de quebra do DNA, facilitando a sua determinação (Técnicas: TUNEL; e ISNT (In Situ Nick Translation) (GOSÁLVEZ et al, 2006)).

As técnicas mais utilizadas para avaliar a integridade do DNA espermático são: SCSA, TUNEL e o COMETA (SCGE) (SERGERIE et al, 2005). A SCSA desenvolvida por Evenson et al (1980) é baseada na utilização da citometria de fluxo, juntamente com as propriedades metacromáticas da substância fluorescente “acridine orange”, a qual tem afinidade pela fita de DNA (LOVE, 2005), possuindo uma utilização bastante difundida, principalmente, em seres humanos (GOSÁLVEZ et al, 2006), além de ser considerada a mais aceita pelos pesquisadores da área (LÓPEZ-FÉRNADEZ et al, 2008). O principio básico desta técnica esta na susceptibilidade do DNA, intacto ou fragmentado, ser desnaturado, onde a cromatina que possui o DNA fragmentado será muito mais susceptível ao processo de desnaturação. Ao se intercalar na fita dupla de DNA, ou seja, no DNA íntegro, este será visualizado

na cor verde, e ao se ligar à porção desnaturada, fragmentada da fita, emitirá uma fluorescência alaranjada, permitindo assim, que se contabilizem essas células com o auxílio do uso do Citômetro de Fluxo, mensurando-se então o grau da fragmentação do DNA espermático (GOSÁLVEZ et al, 2006).

O teste COMETA se baseia na utilização da técnica de eletroforese. Desta forma, um núcleo fragmentado, que não contenha proteínas e esteja danificado, será movimentado com mais facilidade ao campo elétrico positivo, sendo que esta movimentação será proporcional ao tamanho dos fragmentos (GOSÁLVEZ et al, 2006), gerando uma imagem semelhante à cauda de um cometa. Os espermatozoides com DNA íntegro geram uma imagem discreta da cauda (GOSÁLVEZ et al, 2006). Em humanos tem sido bastante útil para avaliar a integridade do DNA espermático e a qualidade do sêmen (IRVINE et al, 2000), bem como danos causados pelos processos de manipulação do sêmen, como os de criopreservação (STEELE et al, 2000).

O teste TUNEL é baseado na técnica de introduzir nucleotídeos conhecidos modificados nos locais de quebra do DNA, através de uma reação enzimática com a ”terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT) fazendo assim com que estes sejam visualizados. Estes nucleotídeos sofrem reações com anticorpos conjugados à sonda fluorescente, sendo mais tarde analisados por microscopia de fluorescência ou com uso do Citômetro de Fluxo (GOSÁLVEZ et al, 2006).

Dalzell et al (2004) realizaram o primeiro estudo que avaliou os efeitos da incubação curta (4hr) e longa (24hr) a uma temperatura de 37°C sobre a integridade da cromatina espermática, resultados estes também observados por López-Férnandez et al (2007) e Farrás (2012), os quais constataram que as alterações no DNA foram evidenciadas após o período de incubação, e que a avaliação da fragmentação do DNA espermático antes e após incubação tem se mostrado de grande importância, levando a crer que este parâmetro deve ser analisado de forma ampla e não como um dado pontual e único.

Algumas das técnicas utilizadas para a determinação da fragmentação espermática são consideradas limitadas para uso rotineiro, por necessitarem de aparelhos de alto valor, ou por utilizarem enzimas cujo acesso ao DNA pode ser difícil e por serem métodos trabalhosos para um exame de rotina laboratorial (ENCISO et al, 2006).

Outra técnica que esta sendo cada vez mais utilizada é o SCDtest, que se baseia em produzir uma descondensação diferencial entre as cromatinas que se encontram fragmentadas das que se encontram intactas. A avaliação é realizada em microscopia de fluorescência pela visualização de dois morfonucleotipos diferentes: 1-compacto ou com pequeno halo de dispersão (DNA intacto); 2- com largo ou moderado halo de dispersão (DNA fragmentado) (GOSÁLVEZ et al, 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*, v.9, n.4, p.331-345, 2003.

AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, v.79, p.829-843, 2003.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction: review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.3, p.28, 2005.

AHMADI, A.; NG, S-C. Fertilizing ability of DNA damaged spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*, v.284, p.696-704, 1999.

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, v.9, p.367-376, 1988.

AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. *Reproduction Fertility Development*, v.6, p. 9-24, 1994.

AITKEN, R.J., GORDON, E. HARKISS, D., TWIGG, J. P., MILNE, P., JENNINGS, Z., AND IRVINE, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.59, p.1037-1046, 1998.

AITKEN, R.J. The amoroso lecture. The human spermatozoa – a cell in crisis. *Journal o Reproduction and Fertility*, v.115, p.1-7, 1999.

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Journal o Reproduction and Fertility*, v.122, p.497–506, 2001.

AITKEN, R.J. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.655-664, 2004.

AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, fertility and development*, v.16, p.581-588, 2004.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. Biologia molecular da célula. 3° edição, Editora Artes Médicas, p.1294, 1997.

ALTHOUSE, G. C., WILSON, M.E., KUSTER, C., PARSLEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*, v.50, p.535-546, 1998.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JR, J. The effect of breeds spermatic parameters over equine semen freezability. In: SYMPOSIUM ON STALLION SEMEN, Amersfoort. *Proceedings*… p. 82, 1996.

ALVARENGA, M.A. *Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões*. 2003. Tese (Livredocência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T. Biotecnologia em reprodução equina: O que há de novo para o veterinário de campo? *Brazilian Journal of Equine Medicine*, v.14, p.26-30, 2007.

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

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992, p. 715-745.

ANDRADE, E.; MELO-STERZA, F.; SENEDA, M.; ALFIERI, A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v.34,n.2, p.79-85, 2010.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M.. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozóides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo, *Acta Scientiae Veterinariae*. 31 (Suppl.), 2003.

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

AURICH, C. Recents advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*, v. 107 (3-4), p. 268-275, 2008.

BALHORN, R., COSMAN, M., THORNTON, K., KRISHNAN, V.V., CORZETT, M., BENCH, G., KRAMER, C., LEE, J., HUD, N.V., ALLEN, M., PRIETO, M., MEYER-ILSE, W., BROWN, J.T., KIRZ, J., ZHANG, X., BRADBURY, E.M., MAKI, G., BRAUN, R.E., BREED, W. Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm.In: GAGNON, C., Ed.1, The Male Gamete: From Basic Knowledge to Clinical Applications. Illinois: Cache River Press, p.55-70, 1999.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research*, v. 62, n. 4, p. 508-515, 2001.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5oC. *Theriogenology*, v.56, p.577-589, 2001.

BALL, B.A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. *Journal of Andrology*, v. 23, n. 2, p. 259-269, 2002.

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

BALL, B.A. Oxidative stress in sperm. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. *Equine Reproduction*. 2. ed. USA: Blackwell Publishing Ltd, 2011. v.1, cap.98, p.991-995.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, p.285, 1989.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.181-190, 2001.

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

BAUMBER, J., BALL, B.A., LINFOR, J.J., MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenology*, v.58, p.301-302, 2002.

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

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*, v.66, p.772-229, 2005.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H2O2 mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v.56, p.275-286, 2001.

BLIER P.U.; DUFRESNE F.; BURTON R.S. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends Genet*, v.17, p. 400-406, 2001.

BONNES-TAOUREL, D.; GUÉRIN, M.-C.; TORREILLES, J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? *Biochemical Pharmacology*, v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.

BRINSKO, S. P. & VARNER, D. D. Artificial insemination and preservation of semen. In: BLANCHAR, T.L.; VARNER, D.D. Stallion management. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.8, n.1, p.205-218, 1992.

BRINSKO, S.P., CROCKETT, E.C., SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v.54, p.129-136, 2000.

BRITO, L.F.C. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techiniques in Equine Practice*, v.6, p.249-264, 2007.

BUNGUM, M., HUMAIDAN, P., SPANÓ, M., JEPSON, K., BUNGUM, L., GIWERCMAN, A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reproduction*, v.19, n.6, p. 1401-1408, 2004.

BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology*, v.67, p.580-589, 2007.

BURNAUGH, L.; BALL, B.A.; SABEUR, K.; THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Animal Reproduction Science*, v.117, p.249-260, 2010.

BURRELLO, N., ARCIDIACONO, G., VICARI, E., ASERO, P., DI, B.D., DE, P.A. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligoasthenoteratozoospermia have an increased aneuploidy rate. *Human Reproduction*, v.19, p.2298-2302, 2003.

CARON, N., VEILLEUX, S., BOISSONNEAULT, G. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Molecular Reproduction and Development*, v.58, p.437–443, 2001.

COSSON, J.A. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. *Cell Biol Int*, v.20, p.83-94, 1996.

CRESPILHO, A.M.; NICHI,M.; GUASTI,P.N.; FREITAS-DELLAQUA,C.P.; SÁ FIHLO, M.F.; MAZIERO, R.R.; DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F.O. Sperm fertility and viability following 48h of refrigeration:Evaluation of different extenders for the preservation of bullsemen in liquid state. *Animal Reproduction Science*, v.146, p.126-133, 2014.

D'OCCHIO, M., HENGSBERGER, K.; JONHSTON, S. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal Reproduction Science*, v.101, p.1-17, 2007.

DADOUNE, J.P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microscopy Research and Techinique*, v.61, p.56–75, 2003.

DALZELL, L.H., MCVICAR, C.M., LUTTON, D., LEWIS, S.E.M. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertility and Sterility*, v.82, n.5, p.1443-1445, 2004.

DE AMBROGI, M., SPINACI, M., GALEATI, G., TAMANINI, C. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p.1994-2000, 2006.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology*, v. 13, p. 368-378, 1992.

DE YEBRA, L., BALLESCA, J.L., VANRELL, J.A., CORZETT, M., BALHORN, R., OLIVA, R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine 2 levels. *Fertillity and Sterility*, v.69, p.755–759, 1998.

DIPLOCK, A.T. Antioxidants and free radicals scavengers. In: RICE-EVANS, C.A, BURDON, R.H, eds. Free radical damage and its control. Amsterdam: Elsevier, 113, 1994.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, Á.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZSANTOS, M.R.; DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; ROS-SANTAELLA, J.L. Comparison of TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.360-368, 2010.

DONNELLY, E.T., STEELE, E.K., MCCLURE, N., LEWIS, S.E. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reproduction*, v.16, p.1191-1199, 2001.

DOWLING DK, SIMMONS LW . Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc R Soc Lond B*, v.276, p.1737-1745, 2009.

ENCISO, M., LÓPEZ-FERNANDEZ, C., FERNANDEZ, J.L., GARCIA, P., GOSÁLBEZ, A., GOSÁLVEZ, J. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*, v.65, p.308-316, 2006.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*. p. 1131-1133, 1980.

EVENSON, D.P., JOST, L.K., MARSHALL, D., ZINAMAN, M.J., CLEGG, E., PURVIS, K., DE ANGELIS, P., CLAUSSEN, O.P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, v.14, p.1039–1049, 1999.

EVENSON, D.P., LARSON, K.J., JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*, v.23, p.25-43, 2002.

FARRÁS, M.C. Avaliação da fragmentação do DNA espermático de sêmen refrigerado de garanhões. (dissertação). Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2012.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n., p. 61-68, 1997.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.; STOUT, T.A.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 68, p. 249-65, 2001.

GARCÍA-PEIRÓ, A.B.S.; MARTÍNEZ-HEREDIA, J.; LOIVER-BONET, M.; ABAD, C; AMENQUAL, M.J.; NAVARRO, J.; JONES, C.B.S.; COWARD, K.; GOSÁLVEZ, J.; BENET, J. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertility and Sterility*, v. 95, n.1, p.105-109, 2011.

GARNER D., THOMAS C., JOERG H., DEJARNETTE J., MARSHALL C. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* v.57, p.1401–1406, 1997.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, v. 63, p. 445-57, 2005.

GORCZYCA, W., TRAGANOS, F., JESIONOWSKA, H., DARZYNKIEWICZ, Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental Cell Research*, v.207, p.202-205, 1993.

GOSALVEZ, J., FERNANDEZ, J.L., GOYANES, V., LÓPEZ-FERNANDEZ, C. Análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD). *Biotechnology*. v.1, p.38-51, 2006.

GOSÁLVEZ, J.; LÓPEZ-FERNANDEZ, C.; JOSE´ L. FERNÁNDEZ, ANNE GOURAUD; WILLIAM V. HOLT. Relationships Between the Dynamics of Iatrogenic DNA Damage and Genomic Design in Mammalian Spermatozoa From Eleven Species. *Molecular Reproduction & Development*; v.78; p.951–961; 2011.

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

GRAHAM, J.K. Principles of Cooled Semen. In: *Equine reproduction*, p. 1308, 2010.

HAAF, T. AND WARD, D.C. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridisation and extended chromatin fibres. *Experimental Cell Research*, v. 219, p.604–611, 1995.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine*, v.91, p.14–22, 1991.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans*. v.35, p.1147– 1150, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol*, 70(6), p.737-757, 1989.

HOFFMANN, N.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified “good” or “poor” for freezing. *Animal Reproduction Science*, v.125, p.112-118, 2011.

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

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

HONDA A, SIRUNTAWINETI J, BABA T. Role of acrosomal matrix proteases in sperm-zona pellucida interations. *Human Reproduction Update* v.8, p.405-12, 2002.

IJAZ, A.; DUCHARME, R. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C. *Theriogenology*, v.44, p.1039-1050, 1995.

IRVINE DS, TWIGG J, GORDON E, FULTON N, MILNE P, AITKEN RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *Journal of Andrology*, v.21, p. 33-44, 2000.

JANUSKAUSKAS, A, JOHANNISSON, A, SODERQUIST, L, RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to the fertility of Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*, v.53, p.859–75, 2000.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. *Theriogenology*, v.48, p.1217-1227, 1997.

KHLEBNIKOV, A.I.; SCHEPETKIN, I.A.; DOMINA, N.G.; KIRPOTINA, L.N.; QUINN, M.T. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg. Med. Chem*. v.15, p.1749–1770, 2007.

KIERSZENBAUM, A.L. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Molecular Reproduction and Development*, v.58, p.357–358, 2001.

KODAMA, H., YAMAGUCHI, R., FUKUDA, J., KASAI, H., TANAKA, T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility*, v.68, p.519-524, 1997.

KOPPERS, A.J.; DE IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M.; McLAUGHLIN, E.A.; AITKEN, J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.93, p.3199-3207, 2008.

KRAMMER, P.H., BEHRMANN, I., DANIEL, P., DHEIN, J. AND DEBATIN, K.M. Regulation of apoptosis in the immune system. Current Opinions in Immunology, v.6, p.279–289, 1994.

L´EVESQUE, D., VEILLEUX, S., CARON, N., BOISSONNEAULT, G. Architectural DNA binding properties of the transition proteins 1 and 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.252, n.3, p.602–609, 1998.

LARSON-COOK, K.L., BRANNIAN, J.D., HANSEN, K.A., KASPERSON, K.M., AAMOLD, E.T., EVENSON, D.P. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertility and Sterility*, v.80, p.895-902, 2003.

LOOMIS, P. R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: Annual Convention Of American Association Of Equine Practioners, 38., 1992. Proceedings..., 1992. p.629-647.

LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 22, p.663-676, 2006.

LOPES, S., JURISICOVA, A., SUN, J.G., CASPER, R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, v.13, p.896-900, 1998.

LÓPEZ-FERNANDEZ, C., CRESPO, F., ARROYO, F., FERNANDEZ, J.L., ARANA, P., JOHNSTON, S.D., GOSALVEZ, J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion. *Theriogenology*, v.68, p.1240-1250, 2007.

LÓPEZ-FERNANDEZ, C., PEREZ-LHANO, B., GARCIA-CASADO, P., SALA, R., GOSALBEZ, A., ARROYO, F., FERNANDEZ, J.L., GOSALVEZ, J. Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Animal Reproduction Science*. v.103, p.87-98, 2008.

LOVE, C.C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. *Animal Reproduction Science*. v.89, p.39–45, 2005.

LOVE, C.C.; KENNEY, R.M. the relationship of increased susceptibility of sperm dna to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*, v. 50, p. 955-72, 1998.

MAIA, M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase. 2006. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MAIA, M.; BICUDO, S. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* v.33, n.4, p.183-193, 2009.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress & male infertility. *Indian Journal of Medical Research*. v.129, p.357–367, 2009.

MARLIN, D.J.; FENN, K.; SMITH.; DEATON, C.D.; ROBERTS, C.A.; HARRIS, P.A.; DUNSTER, C.; KELLEY, F.J. Changes in circulatory antioxidant status in horses during prolonged exercise. *J. Nutr*, v.132(6), p.1622-1672, 2002.

MAZIERO, R.R.D. Comparação entre diferentes taxas de congelação e volumes de armazenamento de sêmen na viabilidade espermática em garanhões de alta e baixa congelabilidade (dissertação). Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010.

MCCARREY, J.R. Spermatogenesis as a model system for developmental analysis of regulatory mechanisms associated with tissue-specific gene expression. *Cell & Development Biology,* v.9, p.459–466, 1998.

MEDEIROS, A.S.L. Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioproteores para espermatozóides de garanhões. Dissertação (Mestrado) Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2003.

MEISTRICH, M.L. Histones and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis. In: HNILICA, L.S., STEIN, G.S., STEIN, J.L. (Eds.), Histones and Other Basic Nuclear Proteins. Boca Raton, Florida, CRC Press, p.165–182, 1989.

MEISTRICH, M.L., TROSTLE-WEIGE, P.K., LIN, R., BHATNAGAR, Y.M., ALLIS, C.D. Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. *Molecular Reproduction and Development*, v.31, p.170–181, 1992.

METCALF, E.S. The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology*, v. 68, p. 423-428, 2007.

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

MORREL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A.M.; HAMMAR, L.; SANDEBERT, T.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Vet Scand*, v.50, p.2, 2008.

MORRIS, I.D., ILOTT, S., DIXON, L., BRISON, D.R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by singlecell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilisation and embryo development. *Human Reproduction*, v.17, p.990–998, 2002.

MORTE, M.I; RODRIGUES, A.M.; SOARES, D.; RODRIGUES, A.S.; 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.

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

MOUSTAFA, M.H., SHARMA, R.K., THORNTON, J., MASCHA, E., ABDEL-HAFEZ, M.A., THOMAS, A.J., AGARWAL, A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*, v.19, p.129-138, 2004.

NICHI, M., BOLS, P.E.J., ZÜGE, R.M., BARNABE, V.H., GOOVAERTS, I.G.F., BARN-ABE, R.C., CORTADA, C.N.M. Seasonal variation in semen qualityin Bos indicus and Bos taurus bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, v.66, p.822–828, 2006.

NOLL, M. Internal structure of chromatin subunit. *Nucleic Acids Research*, v.1, n.11, p.1573-1578, 1974.

NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J.; Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med*, v.31, p.1287-1312, 2001.

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

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, v.12, p.913-922, 2007.

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

PICKETT, B.W. The stallion: Retrospective analysis and opinions. *Biolology Reproduction* (Mono 1), p.547-564, 1995.

RAMALHO-SANTOS, J, SCHATTEN, G, MORENO, RD. Control of membrane fusion during spermiogenisis and the acrosome reaction. *Biol Reprod*, v.67, p.1043-51, 2002.

SAILER, B.L., JOST, L.K., EVENSON, D.P. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay (TDTA). *Journal of Andrology*, v.16, p.80–87, 1995.

SAKKAS, D., MARIETHOZ, E., MANICARDI, G., BIZZARO, D., BIANCHI, P. G., BIANCHI, U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction*, v.4, p.31-37, 1999.

SAKKAS, D., MOFFATT, O., MANICARDI, G. C., MARIETHOZ, E., TAROZZI, N., BIZZARO, D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of Reproduction*, v.66, p.1061–1067, 2002.

SAKKAS, D., ALVAREZ, J.G., Sperm DNA fragmentation: mechanisms oforigin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil. Steril*. v.93, p.1027–1036, 2010.

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

SCHULZE-OSTHOFF, K., WALCZAK, H., DROGE, W. AND KRAMMER, P. H. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. *Journal of Cell Biology*, v.127, p.15–20, 1994.

SENGER, P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition. Ed.1, Washington, Current Conceptions Inc., 1999.

SERGERIE, M., LAFOREST, G., BUJAN, L., BISSONNETTE, F., BLEAU, G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. *Human Reproduction* v.20, p.3446-3451, 2005.

SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: produção e efeitos sobre a integridade estrutural e funcional dos espermatozóides. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.13, p.9-16, 2010.

SMITH, R., VANTMAN, D., PONCE, J., ESCOBAR, J., LISSI, E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Human Reproduction*, v.11, n.8, p.1655-1660, 1996.

SQUIRES, E. L., BRUBAKER, J. K., MCCUE, P. M., PICKETT, B. W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*, v.28, p.709-718, 1998.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences – Colorado State University, Bulletin nº9, 1999.

STEELE, E.K., MCCLURE, N., LEWIS, S.E. Comparison of the effects of two methods of cryopreservation on testicular sperm DNA. *Fertility and Sterility*, v.74, p.450-453, 2000.

STEGER, K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat Embryol*, v.199, p.471–487, 1999.

SUDA, T., TAKAHASHI, T., GOLSTEIN, P. AND NAGATA, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*, v.75, p.1169–1178, 1993.

SUN, J., JUIRISICOVA, A., CASPER, R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, v.56, p.602–607, 1997.

TESARIK, J., GRECO, E., COHEN-BACRIE, P., MENDOZA, C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Molecular Human Reproduction,* v.4, n.8, p.757–762, 1998.

VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P.; Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p.47-53, 2007.

VARNER, D.D.; JOHNSON, L. From a sperm's eye view - Revisiting Our Perception of This Intriguing Cell. *AAEP Proceedings*, v. 53, 2007.

VARNER, D.D.D.; GIBB, Z.; AITKEN, R.J. *Stallion fertility*: A focus on the spermatozoon. Equine Veterinary Journal, v.47, p.16-24, 2015.

VERNET, P.; RIGAUDIERE, N.; GHYSELINCK, N.; DUFAURE, J.P.; DREVET, J.R. In vitro expression of a mouse tissue-specific glutathione peroxidase protein lacking selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochem Cell Biol*, v.74, p.125-131, 1996.

VERNET, P.; FAURE, J.; DUFAURE, J.P.; DREVET, J.R. Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol Reprod Dev*, v.47, p.87-98, 1997.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Science Veterinary*, v.35 (Suplemento 3), p.915-919, 2007.

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.

WARD, W.S., KISHIKAWA, H., AKUTSU, H., YANAGIMACHI, H., YANAGIMACHI, R. Further evidence that sperm nuclear proteins are necessary for embryogenesis. *Zygote*, v.8, p.51–56, 2000.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G.J.E., CLARKE, A. (eds.). Effects of low temperatures on biological membranes. New York, p.189-218, 1981.

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

WOLFFE, A.P. Transcriptional regulation in the context of chromatin structure. *Essays in Biochemistry*, v.37, p.45–57, 2001.

ZHAO, M., SHIRLEY, C.R., YU, Y.E., MOHAPATRA, B., ZHANG, Y., UNNI, E., DENG, J.M., ARANGO, N.A., TERRY, N.H.A., WEIL, M.M., RUSSELL, L.D., BEHRINGER, R.R., MEISTRICH, M.L. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Molecular and Cellular Biology*, v.21, p.7243–7255, 2001.

Capítulo 2

Trabalho a ser enviado à Theriogenology.

Efeito do estresse oxidativo nas características espermáticas de garanhões bad e good freezer

Marcel Cavalcanti Farrás[1], Carlos Ramires Neto[1], Eduardo Gorzoni Fioratti[1], Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua[1], Marcílio Nichi[2], Marco Antônio Alvarenga[1], Frederico Ozanan Papa[1], José Antônio Dell'Aqua Junior[1]

[1]Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.
[2]Faculdade de Medicina Veterinária – USP – São Paulo – Departamento de Reprodução Animal.

RESUMO

Apesar de participar de eventos fisiológicos, o aumento excessivo de espécies reativas de oxigênio e consequentemente do estresse oxidativo, induz a lipoperoxidação da membrana plasmática, comprometendo as funções espermáticas. Com objetivo de avaliar a influência do estresse oxidativo e suas consequências no sêmen congelado de garanhões, os animais foram agrupados em função da sensibilidade frente ao processo da congelação espermática, subdividindo-os em "bad" e "good freezers". Para avaliação das amostras seminais foi realizada análise computadorizada de cinética espermática, análise e quantificação do estresse oxidativo pela mensuração das quantidades de substâncias reativas ao acido tiobarbitúrico (TBARS), análise da fragmentação do DNA espermático (HALOMAX) e análises de translocação de fosfolipídios da membrana, índice de caspase ativada e quantificação de espécies reativas de oxigênio pela citometria de fluxo. Não houve influência do fator racial na qualidade espermática das análises realizadas e o grupo dos garanhões Bad Freezer, além de apresentar maior perda de qualidade seminal após a congelação espermática, revelou maiores níveis de estresse oxidativo associado a um maior índice de fragmentação do DNA espermático, sendo, estes resultados, demonstrados de forma amplificada após a realização de testes sob condições de estresse, o qual se mostrou uma

maneira mais confiável e criteriosa de se avaliar as amostras e predizer a viabilidade espermática e seu potencial fertilizante. Assim, a sensibilidade e/ou resistência à congelação espermática parece estar mais envolvidas com a diversidade individual do que o fator racial. Além disso, os garanhões Bad Freezer apresentam maior susceptibilidade aos danos causados pelo estresse oxidativo e consequentemente à fragmentação DNA espermático.

Palavras-chave: Equino, sêmen congelado, criopreservação, TBARS, fragmentação do DNA.

1. INTRODUÇÃO

A utilização do sêmen congelado possibilita a potencialização do uso de reprodutores em situações na qual a monta natural ou inseminação artificial não seria possível, diminuindo distâncias e prolongando a vida reprodutiva dos garanhões, até mesmo após sua morte (MOORE et al., 2005). Diante disso, muitos estudos têm sido realizados buscando melhorar a qualidade do sêmen pós-descongelação e consequentemente aumentar os índices de fertilidade, já que esta biotécnica não apresenta resultados satisfatórios quando comparado ao uso do sêmen a fresco e refrigerado (WATSON, 2000).

Dentre os fatores que influenciam na qualidade do sêmen congelado, a taxa de resfriamento, a composição dos diluentes e crioprotetores, a estabilidade e integridade da membrana plasmática, o estresse oxidativo, a presença de antioxidantes são algumas das causas relacionadas diretamente ao sucesso da técnica (WATSON, 2000; METCALF, 2007). Seja pela falta de proteção ou pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), o estresse oxidativo se caracteriza como um desequilíbrio entre esses fatores (DIPLOCK, 1994), o que leva à lipoperoxidação da membrana plasmática e consequentemente compromete a integridade espermática e suas funções (MORTE et al., 2008).

Ortega-Ferrusola et al. (2009) verificaram que a peroxidação lipídica da membrana plasmática apresenta uma correlação negativa com a viabilidade espermática, influenciando diretamente na resistência seminal durante o processo de criopreservação e consequentemente na fertilidade, já que afeta a reação acrossomal e prejudica a fusão com o oócito, por alterar a fluidez da membrana plasmática (BALL, 2011). Além disso, sabe-se que a presença de

EROs e o estresse oxidativo são alguns dos fatores envolvidos na fragmentação do DNA espermático, que por ser essencial a manutenção de sua integridade para a correta transmissão da informação genética e desenvolvimento de um novo indivíduo também influenciam de forma negativa nos índices de fertilidade (AGARWAL e SAID, 2003).

Alguns garanhões respondem de forma satisfatória às mudanças e transformações impostas pela congelação espermática, já outros são considerados intolerantes ao processo. Devido aos diversos fatores envolvidos na maior ou menor sensibilidade frente à congelação espermática, o objetivo do presente estudo foi verificar a influência do fator racial e do estresse oxidativo no sêmen congelado de garanhões sensíveis e resistentes ao processo de congelação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Audrich do Brasil e os diluentes da Botupharma, Botucatu, Brasil.

2.1 Animais e critérios de inclusão

Foram utilizados dois ejaculados de 32 garanhões, das raças Mangalarga Marchador (n=16) e Quarto de Milha (n=16), com idade entre 07 e 15 anos, alojados em haras de propriedade particular. Somente ejaculados com motilidade total > 60%, patologias espermáticas ≤ 30%, e animais com histórico reprodutivo com fertilidade > 70% com sêmen a fresco foram utilizados.

Os animais foram agrupados em função da sensibilidade ao processo de congelação seminal referente aos valores de Motilidade Total (MT) do sêmen fresco (M0) e pós congelação (M1) de acordo com a fórmula:

$$perdaMT = \left(1 - \frac{\mathrm{MT(M1)}}{\mathrm{MT(M0)}}\right) x100$$

-*Bad Freezer* (n=13): Animais que apresentaram valores de *perda MT* > 40% (Mangalarga Marchador, n=8 e Quarto de Milha, n=5).

-*Good Freezer* (n=12): Animais que apresentaram valores de *perda MT* < 25% (Mangalarga Marchador, n=6 e Quarto de Milha, n=6).

Sete animais (Mangalarga Marchador, n=2 e Quarto de Milha, n=5) apresentaram valores de *perda MT* entre 26 e 39% e foram descartados das analises estatísticas.

2.2 Coleta e processamento do sêmen

A coleta do sêmen foi realizada com vagina artificial modelo Botucatu. Após a coleta, os ejaculados foram filtrados para descarte da fração gel. O volume foi mensurado em proveta graduada e uma alíquota separada para avaliação da concentração e cinética espermática. O ejaculado foi acrescido com diluente comercial à base de leite desnatado (Botu-sêmen®), na proporção de 1:1 para que se desse início ao processo de congelação.

Após a diluição do sêmen as amostras foram centrifugadas a 600 x g por 10 minutos (DELL`AQUA et al., 2001). O sobrenadante foi desprezado e o "pellet" ressuspendido e homogeneizado com o diluente Botucrio® para a concentração de $200x10^6$ espermatozoides por mililitro. As palhetas de 0,5 mL foram envazadas e mantidas a temperatura de 5°C por 20 minutos. Após este período, as palhetas foram acondicionadas em caixa isotérmica com capacidade de 45 litros, previamente preenchida com nitrogênio líquido dispostas horizontalmente a 6,0 cm acima do nível do nitrogênio por 20 minutos. Após este período foram imersas diretamente no nitrogênio liquido (PAPA et al., 2002). As palhetas foram armazenas em botijão criogênico e descongeladas a 37°C por 20 segundos.

2.3. Análises espermáticas

2.3.1 Cinética Espermática Computadorizada

A análise computadorizada de cinética espermática foi realizada pelo método CASA (Hamilton Thorn – HTMA - IVOS 12) tanto do sêmen fresco diluído como do sêmen pós-descongelação. Foram avaliadas a motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade retilínea (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), linearidade (LIN, %) e percentual de espermatozoides rápidos (RAP, %). As configurações do CASA foram ajustadas de acordo com a espécie (Tabela 1).

Tabela 1. Ajuste do HTMA – IVOS – 12 para as análises seminais em equinos.

Parâmetros	Ajustes
Números de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo das células	03 pixels
Contraste para células móveis	30
Motilidade progressiva	
Velocidade de trajeto (VAP)	>70 µm/s
Retilinearidade (STR)	>80%
Referência para rápidos (VAP)	>80 µm/s
Cutoff para células estáticas	
Velocidade de trajeto (VAP)	<30 µm/s
Velocidade linear (VSL)	<20 µm/s
Magnificação	1,95

2.3.2. Citometria de Fluxo

Para as análises de citometria de fluxo foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa, (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488nm, 100mW, vermelho 640nm, 40mW e violeta 405nm e 100mW. Após a análise, os dados foram arquivados para posterior avaliação em software (FACSDiva^{tm} software v.6,2).

As amostras de sêmen pós-descongelação foram submetidas às avaliações de integridade de membrana plasmática e acrossomal, translocação de fosfolipídios de membrana, índice de caspase ativa e concentração de EROs.

- Integridade de membrana plasmática e acrossomal:

Para esta avaliação, foram utilizadas as sondas iodeto de propídio (IP; P4170, Sigma) e FITC-PSA (L-0770, Sigma) de acordo com Arruda et al. (2003), acrescido da adição de Hoechst 33345 (14533, Sigma) de acordo com Freitas-Dell´Aqua (2011).

Em uma alíquota de 100µL de sêmen diluído em TALP na concentração de $10x10^6$ sptz/mL adicionou-se 5 µL de IP (50µg/mL) e 0,5 µL de FITC-PSA (1 mg/mL) e 5 µL de Hoechst (100µg/mL). A amostra foi então homogeneizada e incubada por 10 minutos a 37°C, após este período acrescentou-se 400 µL de

TALP para efetuar a leitura no equipamento.

- *Translocação de fosfolipídios de membrana:*

Para esta avaliação, uma alíquota 100µL de sêmen foi diluída em solução tampão de anexina V–FITC (6710KK; Pharmingen), pH 7,4 ajustado com NaOH, 140mM NaCl e 2,5mM $CaCl_2$, em uma concentração de $2x10^6$sptz/mL. Esta foi colocada em tubo de 5mL e então acrescido de 5µL de anexina V-FITC, 5µL de iodeto de propídeo (IP; P4170, Sigma, 50µg/mL) e 5µL de Hoechst 33345 (14533, Sigma, 100µg/mL).

A amostra foi homogeneizada e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e então foram adicionados 400µL de solução tampão de anexina V para realizar a leitura no equipamento.

- *Índice de caspase-ativada*

Como marcador *in situ* da caspase ativada utilizou-se a associação de FITC-VAD-FMK (G7462, Promega, Madison WI, EUA) e IP (P4170, Sigma) acrescido de Hoechst 33345 (14533, Sigma) de acordo com Freitas-Della'Aqua (2011).

Em 1mL de solução TALP contendo $1x10^6$ de espermatozoides (100µL de sêmen a $10x10^6$sptz/mL em 900µL de TALP) adicionou-se 1mL de FITC-VAD-FMK a 5mM. Após homogeneização, a amostra foi incubada a temperatura ambiente, ao abrigo da luz, por um período de 20 minutos, centrifugada a 200g por 5 minutos, ressuspendida em TALP na mesma concentração inicial, acrescida de 5µL de IP (50µg/mL) e 5µL de H3342 (100µg/mL) e novamente incubada a temperatura ambiente, ao abrigo da luz por 15 minutos para que fosse então submetida a análise pelo equipamento.

- *Concentração de EROS*

Para análise da concentração de EROs utilizou-se a sonda 5-(-6)-carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceindiacetato (carboxi-H2DCFDA; Molecular Probes) de acordo com Guthrie & Welch (2006). Dessa forma, adicionou-se, à solução contendo $5x10^6$sptz/mL, a sonda carboxi-H2DCFDA (concentração final de 20µM), o iodeto de propídio (1µg/mL; P4170, Sigma) e a sonda

Hoechst 33342 (100µg/mL). Esta, então, foi incubada a 25ºC por 60 minutos ao abrigo da luz para posterior leitura no equipamento.

2.3.3. Estresse Oxidativo pelo método de TBARS

O método de TBARS para avaliação do estresse oxidativo se baseia na mensuração da concentração do malondialdeido (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides. As amostras foram expostas à lipoperoxidação e a leitura da concentração de MDA foi realizada com o auxílio do espectrofluorímetro (GOMEZ, IRVINE E AITKEN; 1998).

Para indução da peroxidação lipídica, adicionou-se 50µL de ácido ascórbico (20 mM) e 50 µL de sulfato de ferro (4 mM) em 200µl da amostra de sêmen descongelado, na concentração de $200x10^6$sptz/ml, em banho-maria (37°C) por um período de 90 minutos.

Após a indução, adicionou-se 600µL de ácido tricloroacétido (TCA 10%) e a amostra foi centrifugada (18.000xg, 15min, 15°C) com objetivo de precipitar as proteínas presentes. Após esta etapa, 800µL de sobrenadante foram adicionados a 800 µL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%), submetidos ao banho–maria (100°C/15min) e imediatamente expostos a 0°C para que se encerrasse a reação.

Nesta reação química, o TBA reage com o MDA resultando em uma coloração rósea quantificada pelo espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences) com comprimento de onda de 532 nanômetros e os resultados expressos em ng de TBARS/10^6sptz.

2.3.4. Fragmentação do DNA Espermático

As análises foram realizadas no sêmen congelado/descongelado e após 4 horas de incubação a 37°C, onde foram avaliadas 200 células em cada momento. Para determinação da fragmentação da cromatina, foi utilizado o kit comercial Halomax® (ChromaCell SL, Madrid, Espanha), específico para a espécie equina, baseado na técnica do Teste de Dispersão de Cromatina Espermática o qual compreende as seguintes etapas: Adição do sêmen a uma solução de agarose, após isto uma alíquota (10µL) da solução de agarose contendo os espermatozoides foi colocada sobre lâminas pré-tratadas

(fornecidas pelo kit) as quais foram recobertas com lamínulas e então refrigeradas por 5 minutos. Após solidificação do gel a lamínula foi cuidadosamente removida e a solução gelatinosa contendo espermatozoides que permaneceu na lâmina foi tratada com uma solução de lise (presente no Kit) por um período de 5 minutos. Sendo então lavada com água destilada durante 5 minutos e desidratada em concentrações crescentes de etanol (70 e 99%) durante um período de dois minutos cada.

Após o processo de desidratação e secagem as lâminas foram submetidas à coloração com a sonda fluorescente SyberGreen II® e avaliadas em microscópio de epifluorescência para determinação do percentual de células com DNA íntegro e lesado, onde foram avaliadas 200 células, sendo as que apresentaram um halo evidente com DNA fragmentado e as que se apresentaram com halo pouco evidente ao redor da cabeça com o DNA não fragmentado, conforme Figura 1.

FIGURA 2: a) Duas células espermáticas com DNA íntegro, presença de halo pequeno; b) Célula espermática com DNA fragmentado, com presença de halo

2.4. Análise Estatística

Para análise estatística, primeiramente avaliou-se, graficamente e com testes de normalidade, a distribuição de todas as variáveis utilizando-se o *Statistical Analysis Software* - SAS versão 9.3 (SAS institute, 2011). Diante desta avaliação, por não apresentarem uma distribuição Normal, optou-se por uma abordagem não paramétrica de todas as variáveis estudadas.

Para comparação da análise dos dados de cinética espermática, citometria de fluxo, microscopia de epifluorescência, fragmentação do DNA espermático e estresse oxidativo foi utilizado o teste de Mann-Whitney, utilizando-se o Instat 5.0 (Graphpad Software Inc., USA). Para todas as análises foi utilizada nível de significância de 0,05.

3. RESULTADOS

Não foi observada diferença estatística (p>0,05) entre as raças, conforme Tabelas 2 a 4, com relação aos parâmetros de concentração do ejaculado, cinética espermática (MT, MP, VAP, VSL VCL, RAP e *perda MT*), integridade de membrana plasmática (IMP), estresse oxidativo (TBARS) e fragmentação do DNA espermático (SDF) tanto no sêmen fresco (M0) quanto no sêmen congelado/descongelado (M1), não havendo assim influência racial no experimento.

Tanto no grupo dos MM como nos QM, o sêmen fresco (M0) apresentou melhores resultados (p<0,05) que o sêmen congelado/descongelado (M1) em todos os parâmetros avaliados (Tabela 2).

TABELA 2: Mediana, mínimo e máximo das características de cinética e integridade da membrana plasmática do sêmen a fresco e pós-descongelação dos garanhões das raças MM e QM.

GRUPOS	MT (%)	MP (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	RAP (%)	IMP (%)
MM (M0)	69^{a}(58-80)	31^{a}(18-48)	117^{a}(92-165)	86^{a}(76-131)	201^{a}(153-265)	60^{a}(44-73)	67^{a}(44-96)
QM (M0)	71^{a}(61-90)	37^{a}(24-64)	111^{a}(102-131)	88^{a}(78-196)	204^{a}(193-224)	65^{a}(45-87)	64^{a}(39-92)
MM (M1)	40^{b}(28-70)	17^{b}(03-41)	77^{b}(24-99)	61^{b}(48-83)	146^{b}(100-188)	23^{b}(11-56)	25^{b}(9-46)
QM (M1)	51^{b}(29-69)	18^{b}(10-29)	82^{b}(56-94)	64^{b}(42-75)	154^{b}(119-176)	33^{b}(15-49)	25^{b}(6-34)

Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Velocidades Média (VAP), Retilínea (VSL) e Real (VCL), percentual de espermatozoides rápidos (RAP), integridade de membrana plasmática (IMP), sêmen a fresco (M0), sêmen pós-descongelação (M1), Mangalarga Marchador (MM), Quarto de Milha (QM).

[ab] Letras minúsculas diferentes entre linhas indicam diferença estatística significativa entre os grupos (p<0,05).

Em relação à perda de Motilidade Total (perda MT), pré e pós-congelação (M0 e M1, respectivamente), entre os grupos MM e QM também não foi possível verificar diferença estatística entre as raças (p>0,05). Os grupos MM e QM também não apresentaram diferença (p>0,05) com relação ao estresse oxidativo do sêmen congelado/descongelado (M1), logo após a descongelação (TBARS-0) e após 4 horas de exposição a 37°C em banho-maria (TBARS-4). O mesmo ocorreu com o índice de fragmentação do DNA espermático logo após a descongelação (SDF0) e após 4 horas de exposição a 37°C em banho-maria (SDF4, Tabela 3).

TABELA 3: Mediana, mínimo e máximo de TBARS e do SDF do sêmen congelado, logo após descongelação e após 4 horas de incubação a 37°C dos garanhões das raças MM e QM.

GRUPOS	TBARS-0	TBARS-4	SDF-0	SDF-4
MM (M1)	1523(793-3333)	1082(505-2948)	13(7,5-18)	23(9,5-57)
QM (M1)	1447(784-2832)	865(446-1564)	12(2,5-24)	20(13-39)

Quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico logo após descongelação e após 04 de incubação a 37°C (TBARS-0 e TBARS-4, ng de TBARS/10^5 células). Índice da fragmentação do DNA espermático logo após descongelação e após 04 de incubação a 37°C (SDF-0 e SDF-4, %). Sêmen pós-descongelação (M1), Mangalarga Marchador (MM), Quarto de Milha (QM). p>0,05 entre os grupos.

Nas análises de citometria de fluxo do sêmen congelado/descongelado (M1), as raças MM e QM não apresentaram diferença estatística significativa (p>0,05) com relação ao número de células íntegras com caspase ativada (CASPASE), células íntegras com translocação de fosfatidilserina (CIAN+) e espécies reativas de oxigênio em células íntegras (ROS CI), conforme Tabela 4.

TABELA 4: Mediana, mínimo e máximo das características de ativação de caspase, translocação de fosfatidilserina e produção de ROS do sêmen congelado dos garanhões das raças MM e QM.

GRUPOS	CASPASE	CIAN+	ROS CI
MM (M1)	0,91(0-20)	2,7(0,3-5,9)	13(1-95)
QM (M1)	0,08(0-5,3)	2,4(0,5-5,5)	7(1-35)

Células íntegras com caspase ativada (CASPASE, %), células íntegras com translocação de fosfatidilserina (CIAN+, %) e espécies reativas de oxigênio em células íntegras (ROS CI, %). Sêmen pós-descongelação (M1), Mangalarga Marchador (MM), Quarto de Milha (QM). p>0,05 entre os grupos.

Os 02 grupos (BF e GF) não apresentaram diferença (p>0,05) com relação à cinética espermática (MT, MP, VAP, VSL, VCL e RAP) e integridade de membrana plasmática (IMP) do sêmen fresco (M0). Entretanto, após a descongelação (M1), foi observada superioridade em todos os parâmetros de cinética espermática do grupo GF quando comparado ao BF. O mesmo não ocorreu com a IMP, que não diferiu (p>0,05) nos 02 grupos. (Tabela 5).

TABELA 5: Mediana, mínimo e máximo das características de cinética e integridade da membrana plasmática do sêmen a fresco e pós-descongelação dos garanhões BF e GF

GRUPOS	MT(%)	MP(%)	VAP(µm/s)	VSL(µm/s)	VCL(µm/s)	RAP(%)	IMP(%)
BF (M0)	68(58-83)	31(18-38)	110(102-132)	85(76-93)	206(176-240)	57(49-78)	63(39-96)
GF (M0)	71(63-90)	36(29-64)	114(92-133)	88(76-131)	199(153-223)	66(44-87)	66(43-92)
BF (M1)	31^{A}(28-40)	12^{A}(6-21)	76^{A}(56-86)	60^{A}(42-71)	141^{A}(100-153)	17^{A}(11-24)	23^{A}(6-35)
GF (M1)	60^{B}(50-70)	25^{B}(15-41)	85^{B}(24-99)	67^{B}(60-83)	162^{B}(144-238)	41^{B}(29-56)	26^{A}(10-45)

Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Velocidades Média (VAP), Retilínea (VSL) e Real (VCL), percentual de espermatozoides rápidos (RAP), integridade de membrana plasmática (IMP), sêmen a fresco (M0), sêmen pós-descongelação (M1), Mangalarga Marchador (MM), Quarto de Milha (QM). ^{AB} Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa entre as linhas no momento M1. (p<0,05).

Os garanhões BF apresentaram uma menor resistência à congelação espermática (p<0,05) quando comparado aos GF (Figura 2).

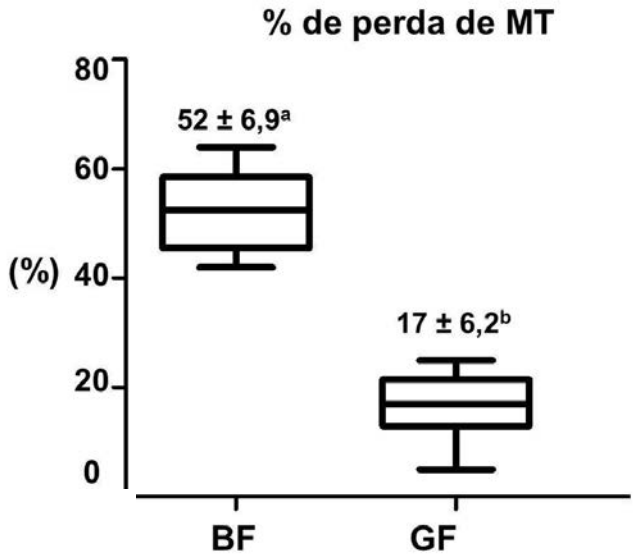

FIGURA 2: Boxplot com média e desvio padrão da % de perda da Motilidade Total entre os momentos pré e pós-congelação so sêmen dos garanhões Bad Freezer (BF) e Good Freezer (GF). ^{ab} Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05) entre os grupos.

Nas análises do estresse oxidativo das amostras do sêmen fresco (M0), armazenadas em nitrogênio líquido logo após a coleta do ejaculado, apesar do grupo BF apresentar maiores resultados que os GF, 210±127 e 167±75 ng de TBARS/10^5 células, respectivamente, não foi possível observar diferença entre os grupos (p>0,05).

Nas avaliações do sêmen pós-descongelação (M1), o grupo BF apresentou uma maior produção de TBARS que os GF (p<0,05) e um maior índice de fragmentação do DNA espermático (p<0,05), no momento logo após a descongelação (TBARS-0 e SDF-0, respectivamente). Após 4 horas de exposição a 37°C em banho-maria, a diferença no índice de fragmentação do DNA (SDF-4) entre os grupos BF e GF se manteve evidente (p<0,05), o que não ocorreu com a produção de TBARS (TBARS-4; p>0,05), que não diferiu entre os grupos (Figura 3).

Ao submeter às células à incubação de 37°C em banho-maria por 4 horas, as diferenças na avaliação do índice de fragmentação do DNA espermático (SDF) se tornaram mais evidentes, havendo um aumento significativo (p<0,05) do SDF após exposição ao desafio (Figura 3).

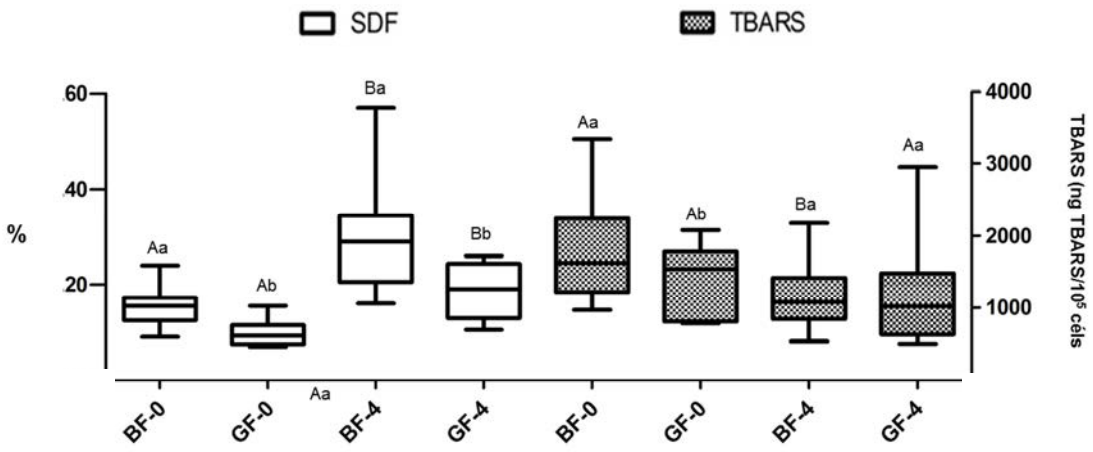

Fig. 03. Bloxpot do efeito da incubação (37°C/4hrs) do sêmen pós-descongelação no índice de fragmentação do DNA espermático (SDF) e na quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, ng de TBARS/10^5 células) dos garanhões Bad Freezer (BF) e Good Freezer (GF). AB Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05) entre os momentos pré (0) e pós-incubação (4), dentro de um mesmo grupo. ab Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística significativa (p<0,05) entre os grupos BF e GF em um mesmo momento.

Nas análises de citometria de fluxo do sêmen congelado/descongelado (M1), não foi observada diferença (p>0,05), entre os grupos BF, e GF, com relação ao total de células integras com caspase ativada (CASPASE), células íntegras com translocação de fosfatidilserina (CIAN+) e nas células íntegras com espécies reativas de oxigênio (ROS CI), conforme Tabela 6.

TABELA 6: Mediana, mínimo e máximo das características de ativação de caspase, translocação de fosfatidilserina e produção de ROS do sêmen congelado dos garanhões Bad Freezer (BF) e Good Freezer (GF).

GRUPOS	CASPASE(%)	CIAN+ (%)	ROS CI (%)
BF (M1)	0,7(0,2-14)	2,4(0,5-5,3)	22(1-95)
GF (M1)	0,1(0-4,8)	1,7(0,2-5,9)	5(1-74)

Células íntegras com caspase ativada (CASPASE, %), células íntegras com translocação de fosfatidilserina (CIAN+, %) e espécies reativas de oxigênio em células íntegras (ROS CI, %). Sêmen pós-descongelação (M1), Bad Freezer (BF), Good Freezer (GF). p>0,05 entre os grupos.

4. DISCUSSÃO

A utilização do sêmen congelado se destaca principalmente pela potencialização do uso de reprodutores em situações adversas, na qual a monta natural ou inseminação artificial não seria possível. Apesar de nosso país ser um dos que mais se utilizam das biotécnicas da reprodução (VIANA e CAMARGO, 2007), os resultados obtidos ainda são muito variáveis, e a aplicação desta biotécnica apresenta grande variação de resultados. A causa dessa situação, provavelmente, não esta ligada somente ao processo biotecnológico, mas também às características e comportamento individual, do ejaculado de cada garanhão que muitas vezes não resistem de forma satisfatória para que se obtenha um potencial fertilizante adequado (BRINSKO et al., 2000).

Na comparação do efeito racial, apesar de alguns estudos apontarem que o sêmen dos MM apresentam uma menor resistência à criopreservação e que animais da raça QM se mostram mais resistentes a esse procedimento (ALVARENGA et al 2005; FARRÁS, 2012), não foi observada diferença, entre os animais MM e QM, tanto no sêmen a fresco quanto pós-descongelado.

Por muito tempo, a seleção genética dos equídeos foi baseada em padrões raciais e de desempenho atlético e raramente visando aspectos

reprodutivos (AMANN e GRAHAM, 1993; LOOMIS, 2006). A divergência frente à literatura pode ter ocorrido devido a uma possível melhora nessa seleção, e valorização dos aspectos reprodutivos, associado aos avanços das biotécnicas da reprodução, visto que, as características relacionadas à congelabilidade são geneticamente transmitidas (THURSTON et al, 2002).

Concordando com Amman e Pickett (1987), também verificamos que indivíduos da mesma raça podem apresentar resultados variáveis frente ao processo de congelação espermática, e que esta variável por si só não deve ser utilizada para determinação da qualidade espermática frente ao processo biotecnológico aplicado. Quando os animais foram subdivididos em bad e good freezer o fator raça não teve influência nos parâmetros avaliados.

Dentre as análises seminais realizadas na rotina de exames andrológicos, a motilidade ainda é considerada uma das formas mais utilizadas de se avaliar a qualidade seminal em várias espécies (CONTRI et al., 2010). Além disso, estudos demonstram que há uma relação entre a viabilidade espermática e os índices de fertilidade, e que animais que possuem maior resistência ao processo de congelação e refrigeração, apresentam uma maior taxa de concepção quando comparado ao grupo de maior sensibilidade (MAZIERO, 2010 e LOVE et al., 2011).

Apesar dos animais BF e GF não apresentarem diferença com relação aos parâmetros de cinética espermática (MT, MP, VAP, VSL, VCL, RAP) no sêmen fresco (M0), após a descongelação (M1), foi observada uma superioridade do grupo GF em todos os parâmetros de cinética espermática quando comparado ao grupo BF, conferindo aos garanhões considerados GF uma maior população de espermatozoides com características desejáveis ao processo de fertilização.

Além das características de cinética espermática, fatores como o estresse oxidativo e a lipoperoxidação da membrana plasmática exercem influência direta sobre a viabilidade e a crio-resistência no sêmen de garanhões (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009), já que as espécies reativas de oxigênio também são consideradas uma das causas da fragmentação do DNA espermático, outro fator relacionado à diminuição dos índices de fertilidade (KODAMA et al., 1997; SUN et al., 1997; AITKEN et al., 1998; LOPES et al.,

1998; IRVINE et al., 2000; AITKEN e KRAUSZ, 2001; MOUSTAFA et al., 2004; GOSÁLVEZ et al., 2006; DE AMBROGI et al., 2006).

Esse fato pôde ser observado no sêmen pós-congelação (M1), no qual os garanhões BF apresentaram níveis mais elevados na concentração de malondialdeido (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides (TBARS) e uma maior susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático do que os garanhões GF. Estes achados concordam com os estudos de Aitken (1999) e Baumber et al. (2002 e 2003) que demonstraram um aumento significativo da fragmentação do DNA espermático quando o sêmen foi exposto a crescentes graus de estresse oxidativo.

O mesmo não ocorreu nas análises de citometria de fluxo, com relação à mensuração da produção de ROS em células íntegras, na qual a produção derivada do metabolismo energético celular foi semelhante entre os grupos ($p>0,05$). O estresse oxidativo, por ser caracterizado como um desequilíbrio entre a quantidade de EROs produzida e as enzimas antioxidantes presentes (DIPLOCK, 1994), e pelo fato de, durante o processo da congelação espermática, o plasma seminal ser retirado juntamente com uma série de enzimas antioxidantes, minerais e proteínas, a mensuração da quantidade de EROs pode não ter refletido a real participação desta variável durante o processo.

A fragmentação do DNA espermático, utilizando o kit comercial Halomax® associado ao método proposto por López-Férnandez et al. (2007) e Dalzell et al. (2004), no qual as alterações da cromatina se evidenciam após exposição das células a uma situação de desafio (exposição a 37°C), apresentou, assim como Farrás (2012), evidências da importância do teste-desafio para a avaliação da fragmentação do DNA espermático. O mesmo ocorreu com a análise de TBARS, técnica que também expõe as células a situações de estresse, amplificando as diferenças entre as amostras e expondo de forma mais evidente as variações individuais, o que nos faz acreditar que as análises espermáticas devem ser realizadas e avaliadas de forma ampla e dinâmica, e não como um dado pontual e único, haja vista que ao utilizarmos testes com etapas de desafio, as diferenças apareceram, o que não aconteceu ao utilizarmos testes pontuais.

Outra observação foi o fato da análise de TBARS associada às 04 horas de exposição a 37°C ter apresentado resultados inconsistentes e inferiores às mesmas avaliações logo após a descongelação. Estes resultados possivelmente ocorreram devido a análise de TBARS já ser um teste que expõe as células a uma situação de desafio, o que associado a outro estresse levou às células à falência metabólica e possivelmente nivelou a avaliação após as 4 horas.

Os garanhões BF apresentaram um maior índice de fragmentação do DNA espermático que os considerados resistentes à congelação (GF) no momento logo após a descongelação (SDF-0), diferença essa que foi acentuada após a incubação das amostras a 37°C por um período de 4 horas (SDF-4). Pelo fato do estresse oxidativo se caracterizar como um dos fatores responsáveis pelo dano da cromatina (IRVINE et al., 2000; AITKEN e KRAUSZ, 2001; MOUSTAFA et al., 2004; GOSÁLVEZ et al., 2006; DE AMBROGI et al., 2006), esses resultados se justificam pela maior concentração de espécies reativas ao acido tiobarbitúrico encontrada nesse grupo (BF) no momento pós-descongelação (TBARS-0). Morte et al. (2008) obtiveram resultados semelhantes ao verificar que com o aumento da peroxidação lipídica e proteica da membrana plasmática e acrossomal do espermatozoide, houve um maior comprometimento da integridade da fita de DNA.

Love (2005) relatou que a fragmentação do DNA espermático é um parâmetro independente e que pode se expressar mesmo com a manutenção de boas características espermáticas. Entretanto foi observado que os garanhões sensíveis à congelação (BF) apresentaram maior perda da motilidade total durante a congelação, maior concentração de substâncias reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e maior fragmentação do DNA espermático (SDF-0 e SDF-4) em relação aos animais com características espermáticas superiores (GF). Esse fato pode estar relacionado a uma espermatogênese mais eficaz, durante a substituição das histonas pela protaminas, no qual os animais GF apresentam uma melhor compactação e consequente proteção do DNA, resultando em menores taxas de fragmentação, especialmente, quando submetidos a situações de estresse.

Kroemer et al. (1997), relatam que a fragmentação do DNA, a produção de EROs e o aumento da permeabilidade da membrana são eventos

associados à apoptose. A avaliação de marcadores apoptóticos, realizada por citometria de fluxo não foi capaz de verificar diferença significativa entre os grupos estudados. Apesar disso, em todas as análises, os BF apresentaram uma maior quantidade de células com caspase ativada. Com relação aos espermatozoides íntegros com translocação de fosfolipídio da membrana (CIAN+) os grupos também apresentaram resultados semelhantes.

Possivelmente, diferenças de fertilidade entre garanhões possam estar relacionadas à resistência espermática frente a testes com fatores estressantes, afinal as avaliações realizadas imediatamente após o processamento das amostras podem não refletir a real viabilidade espermática, visto que essas células são expostas a longos períodos de desafio antes do processo de fecundação.

Apesar das diferenças encontradas entre os garanhões sensíveis e resistentes ao processo de congelação espermática, nosso estudo não foi capaz de definir se as causas dessas diferenças estão relacionadas à maior produção de EROs ou à menor proteção pela atividade antioxidante. Dessa forma, novos estudos relacionados à atividade antioxidante, estresse oxidativo e suas consequências devem ser realizados visando esclarecer estas lacunas e obter assim uma melhor compreensão destes eventos.

As diferenças encontradas nas características espermáticas entre as raças MM e QM podem estar relacionada à diversidade entre indivíduos e não ao fator raça. Já garanhões BF apresentam maior susceptibilidade aos danos causados pelo estresse oxidativo e consequentemente à fragmentação DNA espermático. Além disso, as diferenças e variações individuais, entre os garanhões GF e BF, se evidenciam quando os espermatozoides são submetidos a fatores de estresse, o que nos leva a acreditar que as análises espermáticas deveriam ser realizadas dessa forma, buscando avaliações mais confiáveis para predição da fertilidade.

6. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*, v.9, n.4, p.331-345, 2003.

AITKEN, R.J., GORDON, E. HARKISS, D., TWIGG, J. P., MILNE, P., JENNINGS, Z., AND IRVINE, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.59, p.1037-1046, 1998.

AITKEN, R.J. The amoroso lecture. The human spermatozoa – a cell in crisis. *Journal o Reproduction and Fertility*, v.115, p.1-7, 1999.

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Journal o Reproduction and Fertility*, v.122, p.497–506, 2001.

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

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

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992, p. 715-745.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M.. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozóides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo, *Acta Scientiae Veterinariae*. 31 (Suppl.), 2003.

BAUMBER, J., BALL, B.A., LINFOR, J.J., MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. *Theriogenology*, v.58, p.301-302, 2002.

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

BRINSKO, S.P., CROCKETT, E.C., SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v.54, p.129-136, 2000.

CONTRI, A., VALOR, C., FAUSTINI, M., WEGHER, L., CARLCCIO, A., Effect of semen preparation on casa motility results incryopreserved bull spermatozoa. Therio v.74, p.424-35, 2010.

DALZELL, L.H., MCVICAR, C.M., LUTTON, D., LEWIS, S.E.M. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertility and Sterility*, v.82, n.5, p.1443-1445, 2004.

DE AMBROGI, M., SPINACI, M., GALEATI, G., TAMANINI, C. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p.1994-2000, 2006.

Dell'aqua, J.A., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., Zahn, F.S., 2001. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. Anim. Reprod. Sci. 68, 344–346.

DIPLOCK, A.T. Antioxidants and free radicals scavengers. In: RICE-EVANS, C.A, BURDON, R.H, eds. Free radical damage and its control. Amsterdam: Elsevier, 113, 1994.

FARRÁS, M.C. Avaliação da fragmentação do DNA espermático de sêmen refrigerado de garanhões. (dissertação). Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2012.

FREITAS-DELL'AQUA, C.P. Técnicas avançadas na análise de alterações morfo-funcionais de sêmen equino. (tese). Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2011.

GOMEZ, E.; IRVINE, D.S. E AITKEN, R.J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Journal of Andrology*. V.21, p. 81–94, 1998.

GOSALVEZ, J., FERNANDEZ, J.L., GOYANES, V., LÓPEZ-FERNANDEZ, C. Análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD). *Biotechnology*. v.1, p.38-51, 2006.

GUTHRIE, H.D. e WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *Journal of Animal Science*, v.84, n.8, p.2089-2100, 2006.

IRVINE DS, TWIGG J, GORDON E, FULTON N, MILNE P, AITKEN RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationship with semen quality. *Journal of Andrology*, v.21, p. 33-44, 2000.

KODAMA, H., YAMAGUCHI, R., FUKUDA, J., KASAI, H., TANAKA, T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and Sterility*, v.68, p.519-524, 1997.

KROEMER, G. ZAMZAMI, N., SUSIN, S.A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Tod*, v.18, p.44-51, 1997.

LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 22, p.663-676, 2006.

LOPES, S., JURISICOVA, A., SUN, J.G., CASPER, R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, v.13, p.896-900, 1998.

LÓPEZ-FERNANDEZ, C., CRESPO, F., ARROYO, F., FERNANDEZ, J.L., ARANA, P., JOHNSTON, S.D., GOSALVEZ, J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion. *Theriogenology*, v.68, p.1240-1250, 2007.

LOVE, C.C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. *Animal Reproduction Science*. v.89, p.39–45, 2005.

LOVE CC. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. Theriogenology, v.76, p.547-557, 2011.

MAZIERO, R.R.D. Comparação entre diferentes taxas de congelação e volumes de armazenamento de sêmen na viabilidade espermática em garanhões de alta e baixa congelabilidade (dissertação). Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2010.

METCALF, E.S. The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology*, v. 68, p. 423-428, 2007.

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

MORTE, M.I; RODRIGUES, A.M.; SOARES, D.; RODRIGUES, A.S.; 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.

MOUSTAFA, M.H., SHARMA, R.K., THORNTON, J., MASCHA, E., ABDEL-HAFEZ, M.A., THOMAS, A.J., AGARWAL, A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Human Reproduction*, v.19, p.129-138, 2004.

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

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JR, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.26, p.184-187, 2002.

SAS Institute. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC., 2011.

SUN, J., JUIRISICOVA, A., CASPER, R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*, v.56, p.602–607, 1997.

THURSTON, L.M.; SIGGINS,K.; MILEHAM, A.J.; WATSON, P.F., HOLT, W.V. Identification of amplified restrict fragment length polymorphism marker linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol. Reprod.,* v.66, p.545-554, 2002.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Science Veterinary*, v.35 (Suplemento 3), p.915-919, 2007.

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

Capítulo 3

Influência da presença do plasma seminal na qualidade espermática do sêmen refrigerado de garanhões

Marcel Cavalcanti Farrás[1], Carlos Ramires Neto[1], Eduardo Gorzoni Fioratti[1], Camila de Paula Freitas-Dell'Aqua[1], Marco Antônio Alvarenga[1], Frederico Ozanan Papa[1], José Antônio Dell'Aqua Junior[1]

[1]Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

RESUMO

A diminuição da temperatura, durante a refrigeração, expõe as células espermáticas a situações de desafio, na qual o sêmen de alguns garanhões não responde de forma satisfatória. Dentre os fatores que influenciam na resistência espermática, a presença e/ou ausência do plasma seminal gera opiniões controversas entre os pesquisadores da área. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do plasma seminal sobre a qualidade espermática no sêmen refrigerado (5°C por 24hrs) de garanhões bad coolers e good coolers. Para tanto, as análises de cinética espermática, da integridade de membrana plasmática e do estresse oxidativo foram realizadas logo após a coleta do ejaculado (M0) e após 24hrs de refrigeração a 5°C (M24), com e sem a presença do plasma seminal. Ao retirar o plasma seminal, o sêmen dos garanhões bad coolers apresentou qualidade espermática superior mantendo características desejadas à reprodução. Em contrapartida os good coolers apresentaram qualidade espermática superior na presença do plasma seminal, demonstrando que este exerce função distinta e antagônica no sêmen refrigerado de garanhões, protegendo e beneficiando o sêmen de good coolers e trazendo efeitos deletérios aos espermatozoides de garanhões bad coolers. Assim, devido às características de cada individuo, estratégias específicas e particulares para manipulação do sêmen são uma alternativa na busca de melhores resultados e índices de fertilidade.

Palavras-chave: Equino, sêmen refrigerado, plasma seminal, estresse oxidativo.

1. INTRODUÇÃO

O transporte de sêmen refrigerado está entre as biotécnicas mais utilizadas pelas centrais de reprodução equina no Brasil. Além de possibilitar o uso do sêmen por um período maior, diminuíram-se as distâncias e as centrais de reprodução equina e haras ficaram ainda mais próximos. Ao prolongar a viabilidade espermática pela redução da temperatura, diminuição do metabolismo celular e consequentemente formação de subprodutos deletérios ao sêmen, se possibilita uma maior troca e disseminação do material genético de animais considerados superiores, principalmente em locais na qual a monta natural não seria viável (ALTHOUSE et al., 1998; MOORE et al., 2005; HOFFMANN et al., 2011).

Apesar das vantagens associadas à refrigeração espermática, a redução de temperatura submete as células a situações não fisiológicas, ocasionando uma reorganização nos lipídeos da membrana plasmática e expondo-as a situações que afetam diretamente a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides (HOLT, 2000; GRAHAM, 2010). Além disso, o sêmen de alguns garanhões apresenta baixa resistência à refrigeração e são intolerantes ao processo.

Vários fatores influenciam no sucesso ou fracasso da refrigeração e transporte espermático, dentre eles, a presença ou ausência do plasma seminal, o metabolismo celular e seus subprodutos, o estresse oxidativo, os meios diluentes utilizados, as características morfofuncionais das células espermáticas e seu comportamento frente às taxas de redução da temperatura são alguns dos fatores que influenciam no sucesso da biotécnica.

Na composição do plasma seminal, enzimas e moléculas como a albumina, taurina, piruvato, lactato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotionina auxiliam significativamente na proteção do espermatozoide devido às características antioxidantes dessas substâncias (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1992; BAUMBER et al., 2000; AITKEN 2004; DE AMBROGI et al, 2006). Estas têm por função controlar a concentração de EROs, mantendo-as a níveis fisiológicos, prevenindo assim da ocorrência de danos celulares. Logo, todo mecanismo que diminua a concentração destes antioxidantes, acarreta

em um aumento das espécies reativas de oxigênio, do estresse oxidativo e um consequente aumento no dano celular (BAUMBER et al., 2000; AITKEN 2004).

Apesar do plasma seminal dos equinos apresentar alta atividade neutralizadora de EROs, a quantidade e concentração dos componentes presentes influenciam diretamente na maior ou menor proteção do sêmen, justificando, assim, diferenças individuais encontradas frente à criopreservação espermática (BALL et al., 2001; BALL, 2008). Pela maioria dos trabalhos nessa área não separar os garanhões em função da sensibilidade à refrigeração, é controversa a necessidade da presença ou ausência do plasma seminal na preservação espermática. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da presença e/ou ausência do plasma seminal nas características espermáticas no sêmen de garanhões bad e good coolers.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma Audrich do Brasil e os diluentes da Botupharma, Botucatu, Brasil.

2.1 Animais e critérios de inclusão

Foram utilizados dois ejaculados de 25 garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade entre 07 e 15 anos. Somente ejaculados com motilidade total > 60%, patologia espermática ≤ 30% de animais com histórico reprodutivo com fertilidade > 70% com sêmen a fresco foram utilizados.

Os animais foram agrupados em função da sensibilidade ao processo de refrigeração do sêmen com plasma seminal de acordo com os valores de motilidade total (MT) do sêmen a fresco (M0) e refrigerado a 5°C por um período de 24hrs (M24), de acordo com a fórmula abaixo:

$$perdaMT = \left(1 - \frac{\mathrm{MT(M24)}}{\mathrm{MT(M0)}}\right) x100$$

- Bad Cooler (BC): Animais que apresentaram *perda MT* > 40% (n=10).
- Good Cooler (GC): Animais que apresentaram *perda MT* < 30% (n=08)

Os animais que apresentaram valores de *perda MT* entre 31 e 39% e foram descartados das analises estatísticas (n=07).

2.2 Coleta e processamento do sêmen

A coleta do sêmen foi realizada com vagina artificial modelo Botucatu Após a coleta, os ejaculados foram filtrados em filtro de nylon para que fosse descartada a fração gel, o volume mensurado em proveta graduada e uma alíquota separada para avaliação da concentração e cinética espermática. Cada ejaculado foi então diluído com diluente comercial à base de leite desnatado, Botu-sêmen®, numa concentração de $50x10^6$ sptz/mL.

Para remoção do plasma seminal, o sêmen foi filtrado com o uso do Sperm Filter®, as células espermáticas retidas no filtro foram ressuspendidas com diluente comercial à base de leite desnatado, Botu-sêmen®, para a concentração de $50x10^6$ sptz/mL.

Logo após a coleta e processamento das amostras, estas foram acondicionadas em sistema de refrigeração passiva Botu-Flex® por um período de 24hrs a 5°C.

2.3. Análises espermáticas

2.3.1. Cinética espermática

A análise computadorizada de cinética espermática foi realizada pelo método CASA (Hamilton Thorn – HTMA IVOS 12) tanto no sêmen a fresco como no sêmen refrigerado com e sem plasma seminal. Foram avaliadas a motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade retilínea (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), linearidade (LIN, %), percentual de espermatozoides rápidos (RAP, %). As configurações do CASA foram ajustadas de acordo com a espécie (Tabela 1).

2.3.2. Integridade da membrana plasmática

A integridade de membrana plasmática foi realizada pela técnica de microscopia de epi-fluorescência (LeicaMicrosystem – DMLB, Ernst-Leitz-Strabe, Wezlar Germany) tanto no sêmen a fresco como no sêmen refrigerado

com e sem plasma seminal, utilizando a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceina (CFDA) e iodeto de propídio (IP) segundo metodologia de Harrison e Vickers (1990), na qual 100 células foram identificadas e classificadas, sendo os espermatozoides íntegros corados integralmente de verdes e os espermatozoides lesados corados em vermelho ou em verde e vermelho.

2.3.3. Extresse Oxidativo

Para avaliação do estresse oxidativo foi utilizado o método de TBARS, tanto no sêmen a fresco como no sêmen refrigerado com e sem plasma seminal, que se baseia na mensuração da concentração do malondialdeido (MDA), um subproduto da peroxidação lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides. As amostras foram expostas ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%) que reage com o MDA resultando em uma coloração rósea quantificada pelo espectrofluorímetro (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences) segundo Gomez, Irvine e Aitken (1998). Nesta avaliação as amostras não foram expostas ao processo de lipoperoxidação e desafio, sendo mensurado portanto somente a quantidade de MDA presente na amostra.

TABELA 1. Ajuste do HTMA – IVOS – 12 para as análises seminais em equinos.

Parâmetros	Ajustes
Números de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo das células	03 pixels
Contraste para células móveis	30
Motilidade progressiva	
Velocidade de trajeto (VAP)	>70 µm/s
Retilinearidade (STR)	>80%
Referência para rápidos (VAP)	>80 µm/s
Cutoff para células estáticas	
Velocidade de trajeto (VAP)	<30 µm/s
Velocidade linear (VSL)	<20 µm/s
Magnificação	1,95

2.4. Análise Estatística

Para análise estatística, primeiramente avaliou-se, graficamente e com testes de normalidade, a distribuição de todas as variáveis utilizando-se o *Statistical Analysis Software* - SAS versão 9.3 (SAS institute, 2011). Diante desta avaliação, optou-se por uma abordagem não paramétrica de todas as variáveis estudadas.

Para comparação da análise dos dados de cinética espermática, microscopia de epifluorescência e estresse oxidativo, entre os grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para comparação da análise dos dados de cinética espermática, microscopia de epifluorescência e estresse oxidativo, entre os momentos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, utilizando-se o Instat 5.0 (Graphpad Software Inc., USA).

Para todas as análises foi utilizada nível de significância de 0,05.

3. RESULTADOS

A separação dos garanhões foi efetuada em relação à perda da motilidade total (Perda MT) entre os momentos a fresco e após a refrigeração das amostras com plasma seminal. Os garanhões BC apresentaram valores inferiores ($p<0,05$) após a refrigeração do sêmen (M24) em relação aos GC, dados Tabela 2.

Não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos GC e BC com relação à cinética espermática (MT, MP, VAP, VSL, VCL e RAP), integridade de membrana plasmática e concentração espermática do ejaculado no sêmen fresco (M0), no momento antes da refrigeração (Tabela 3). Após a refrigeração (M24), a análise do sêmen com plasma seminal revelou que o grupo GC apresentou melhores resultados ($p<0,05$) que os BC em todos os parâmetros de cinética espermática (MT, VAP, VSL, VCL e RAP) com exceção da motilidade progressiva ($p>0,05$), a qual não apresentou diferença. Também não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos com relação à integridade de membrana plasmática e a concentração espermática do ejaculado (Tabela 3).

TABELA 2: Mediana, mínimo e máximo da Motilidade Total do sêmen fresco e refrigerado com plasma seminal e da perda da Motilidade Total para seleção dos garanhões GC e BC.

	MOTILIDADE TOTAL (%)		Perda MT (%)
	(M0)	(M24)	
Good Cooler (10)	64[a](61-66)	50[a](46-71)	22[a](11-26)
Bad Cooler (8)	70[a](58-77)	29[b](20-43)	50[b](44-69)

GC, good cooler; BC, bad cooler; M0, sêmen fresco; M24, sêmen refrigerado com plasma seminal; Perda MT, perda de motilidade total entre os momentos M24 e M0. [ab] Letras minúsculas diferentes entre linhas indicam diferença estatística significativa (p<0,05).

Na análise do sêmen refrigerado sem plasma seminal (M24 sem PS) não foi verificado diferença (p>0,05) entre os animais GC e BC em todas as análises de cinética espermática (MT, MP, VAP, VSL, VCL e RAP) e integridade de membrana plasmática, porem podemos averiguar que os GC apresentaram uma piora dos resultados ao se retirar o plasma seminal (M24 sem PS) em todos os parâmetros de cinética espermática (MT, MP, VAP, VSL, VCL e RAP) quando comparado às amostras com plasma seminal (M24 com PS). O oposto ocorreu com os animais BC, ao retirar o plasma seminal, apresentaram uma melhora nos parâmetros de cinética espermática, apesar de não ter sido observada diferença estatística significativa (p>0,05), conforme Tabela 3.

Com relação à produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), apesar de não apresentar diferença (p>0,05), os animais “Bad Cooler” produziram uma maior quantidade de TBARS em todos os momentos quando comparado com os animais “Good Cooler” (Figura 1).

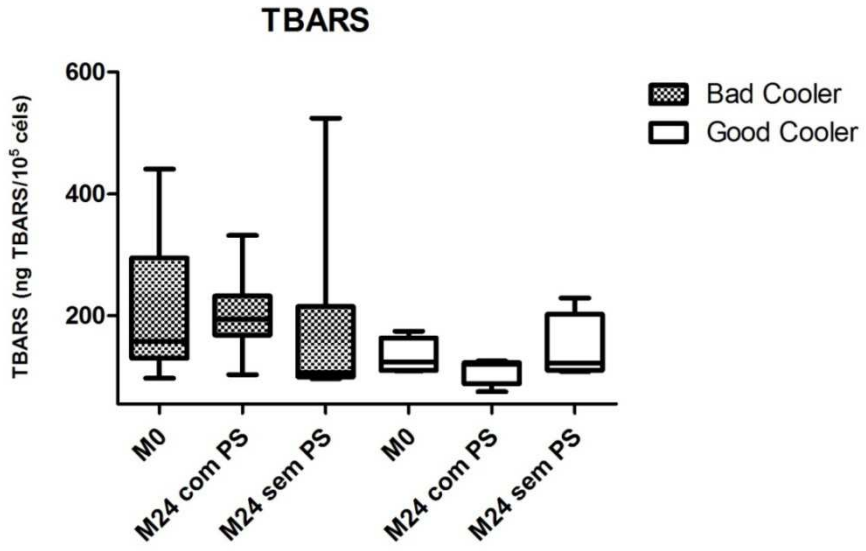

FIGURA 1: Boxplot da quantificação de espécies reativas ao acido tiobarbitúrico (TBARS) do sêmen a fresco (M0) e refrigerado com e sem plasma seminal (M24 com PS e M24 sem PS, respectivamente) dos garanhões bad cooler e good cooler (p>0,05).

TABELA 3: Mediana, mínimo e máximo das características de cinética espermática e integridade da membrana plasmática do sêmen fresco e refrigerado com e sem plasma seminal de garanhões Good Cooler e Bad Cooler.

	GRUPOS	M0	M24 com PS	M24 sem PS
MT	GC	64^{aA}(61-66)	50^{aA}(46-71)	32^{aA}(28-65)
	BC	70^{aA}(58-77)	29^{bB}(20-43)	40^{aAB}(28-82)
MP	GC	32^{aA}(27-38)	25^{aAB}(12-34)	12^{aB}(10-25)
	BC	26^{aA}(18-36)	7^{aB}(3-17)	12^{aAB}(2-17)
VAP	GC	122^{aA}(92-141)	115^{aA}(98-136)	80^{aA}(73-118)
	BC	110^{aA}(24-124)	77^{bA}(65-82)	77^{aA}(59-100)
VSL	GC	93^{aA}(76-102)	86^{aA}(79-94)	64^{aA}(57-87)
	BC	83^{aA}(80-86)	59^{bB}(51-63)	59^{aB}(43-76)
VCL	GC	192^{aA}(156-274)	209^{aA}(175-164)	156^{aA}(142-230)
	BC	221^{aA}(130-238)	156^{bA}(138-178)	149^{aA}(127-189)
RAP	GC	52^{aA}(44-63)	41^{aA}(36-62)	19^{aA}(15-59)
	BC	57^{aA}(49-62)	17^{bB}(7-26)	23^{aAB}(8-72)
IMP	GC	81^{aA}(64-96)	74^{aA}(32-86)	87^{aA}(73-95)
	BC	68^{aA}(65-96)	69^{aA}(55-93)	64^{aA}(56-83)

M0, sêmen fresco; M24, sêmen refrigerado; PS, plasma seminal; MT (%), motilidade total; MP (%), motilidade progressiva; VAP (µm/s), velocidade de trajeto; VSL (µm/s), velocidade retilínea; VCL (µm/s) velocidade curvilinear; RAP (%),espermatozoides rápidos; IMP (%), integridade de membrana plasmática; GC, good cooler; BC, bad cooler. ^{ab}Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre as linhas em um mesmo momento. ^{AB}Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$) entre as colunas em um mesmo grupo.

4. DISCUSSÃO

O sucesso da preservação espermática pela refrigeração está diretamente relacionado a fatores como: diluente, diluição, taxa de refrigeração lenta e temperatura de armazenamento que reduza o metabolismo espermático e minimize os danos à membrana plasmática, mantendo assim a viabilidade espermática e a fertilidade (JASKO et al., 1992; LOOMIS, 1992). Além disso, fatores como a manutenção ou retirada do plasma seminal e sua influência na viabilidade espermática ainda não apresentam um consenso na literatura.

A remoção total do plasma seminal pode ser benéfica ao sêmen refrigerado por 24 e 48 horas, exercendo, inclusive um fator de proteção na

integridade do DNA espermático (LOVE et al, 2005). Entretanto Jasko et al. (1992), Moore et al.(2005) e Loomis (2006) verificaram que a retirada total do plasma seminal pode ser prejudicial à viabilidade espermática e que a presença de 5 a 20% do plasma seminal é benéfica às funções espermáticas. Já estudos com espermatozoides coletados da cauda do epidídimo apresentaram qualidade igual ou até mesmo superior aos coletados no ejaculado e na presença do plasma seminal (MONTEIRO et al., 2011; PAPA, et al., 2008). A maioria desses experimentos não separa os garanhões em função da resistência e/ou susceptibilidade ao processo da criopreservação, podendo ser esse um dos fatores responsáveis pela controvérsia encontrada na literatura quanto à utilização ou não do plasma seminal.

Em relação às características de cinética espermática o grupo de animais GC, apesar de não apresentar diferença significativa entre a utilização ou não do PS durante a refrigeração do sêmen, apresentou uma diminuição de valores na ausência do PS. Esse fato pode estar relacionado à composição do PS desses animais. As concentrações de substâncias que conferem proteção aos espermatozoides como enzimas, proteínas, eletrólitos e hormônios possivelmente se encontram de forma balanceada justificando sua manutenção durante a refrigeração.

A despeito de não haver diferença estatística quando se remove o PS dos garanhões GC, foi observado que todos os parâmetros da movimentação espermática apresentaram valores inferiores aos observados quando a refrigeração foi efetuada na presença do PS. Nesse sentido esses animais demonstram que o melhor protocolo para refrigeração de seus ejaculados seria a não remoção do PS.

Em contrapartida quando se observa a influência da presença ou ausência do PS na refrigeração do sêmen de garanhões BC, verifica-se que a remoção do PS para esses animais proporcionou valores similares aos observados no sêmen a fresco em relação à cinética espermática. Já quando o PS não é removido à movimentação espermática é prejudicada durante a refrigeração. Esse fato pode estar relacionado ao desequilíbrio dos constituintes do PS desses animais, que além de não promover uma proteção espermática influenciam negativamente na manutenção de seu movimento.

Assim sendo, a retirada do PS nos garanhões BC diminui a influência negativa dessa secreção sobre a manutenção dos espermatozoides e o diluente ameniza sua remoção contribuindo para uma melhor manutenção da cinética espermática nesses animais.

Estes achados também são relatados por Brinsko et al. (2000) e Moore et al.(2005) que verificaram que a composição e substâncias encontradas no PS de cada indivíduo, influenciando de forma particular na tolerância ao processo de criopreservação e consequentemente justificando a função antagônica do PS em animais sensíveis e resistentes à refrigeração espermática.

Em relação à manutenção da integridade da membrana plasmática, o PS não influenciou quanto a sua presença ou remoção, esse fato sugere que o desequilíbrio na composição do PS dos garanhões BC pode estar relacionado à deficiência de substratos que contribuam para produção de ATP prejudicando a plena atividade metabólica dos espermatozoides. Já com sua retirada o diluidor aumentou sua proporção em relação à quantidade de espermatozoides fornecendo uma maior quantidade de substâncias que foram convertidas em ATP pela cadeia de produção energética: glicólise, ciclo de ácido cítrico e fosforilação oxidativa.

Esses achados corroboram com os de Rodríguez-Martínez et al. (2011) que relatam que apesar do PS ser importante no transporte espermático durante a ejaculação e no trato reprodutor feminino, não é considerado um meio adequado à manutenção do sêmen durante os processos de criopreservação, sendo necessária sua substituição por diluentes adequados que irão proteger as células durante o processo. Embora o PS dos equinos apresente alta atividade antioxidante e neutralizadora das espécies reativas de oxigênio, sua concentração e mecanismo de ação são influenciados diretamente pela diluição e/ou remoção do PS durante a refrigeração (BALL et al., 2001; BALL, 2008). Além disso, existem variações individuais significativas na composição do PS de diferentes garanhões (BALL et al., 2001; BALL, 2008;BRINSKO et al., 2000; MOORE et al., 2005; AURICH et al., 1996).

O teste do TBARS evidenciou uma similaridade dos valores encontrados antes e após a refrigeração, bem como entre os garanhões BC e GC. Entretanto, pode-se observar que os animais GC apresentaram valores

inferiores na presença do PS, esse menor efeito oxidativo sofrido pelos espermatozoides desses animais pode contribuir para uma manutenção da viabilidade dessas células durante situações de estresse.

Avaliar os diferentes parâmetros espermáticos após um desafio de estresse, talvez, submeteria essas células a demonstrarem sua capacidade de manutenção das características morfofuncionais durante um período de tempo sobre a ação de fatores indesejáveis para sua viabilidade. Avaliações imediatas após procedimentos de criopreservação podem não refletir a real capacidade de fecundação de uma amostra, haja vista que até o momento da fertilização os espermatozoides são submetidos a diversos desafios que selecionam apenas os mais aptos a prosseguirem para os reservatórios do trato genital feminino e posteriormente ao encontro do ovócito.

Com base nos resultados obtidos verificou-se que o PS exerce participação distinta e particular em cada indivíduo, conferindo proteção às células espermáticas de animais GC e influenciando de forma negativa na qualidade espermática de animais sensíveis à refrigeração. Futuros estudos em relação à ação do PS em garanhões GC e BC são necessários expondo as análises espermáticas a situações estressantes.

6. REFERÊNCIAS

AITKEN, R.J. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.655-664, 2004.

ALTHOUSE, G. C., WILSON, M.E., KUSTER, C., PARSLEY, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology*, v.50, p.535-546, 1998.

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

BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; BAUMBER, J.; LIU, I.K. Catalase activity in equine semen. *American Journal of Veterinary Research*, v.61, p.1026-1069, 2000.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5oC. *Theriogenology*, v.56, p.577-589, 2001.

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

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

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

DE AMBROGI, M., SPINACI, M., GALEATI, G., TAMANINI, C. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p.1994-2000, 2006.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *Journal of Andrology*, v. 13, p. 368-378, 1992.

GOMEZ, E.; IRVINE, D.S. E AITKEN, R.J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Journal of Andrology*. V.21, p. 81–94, 1998.GRAHAM, 2010

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.8, p.343–352, 1990.

HOFFMANN, N.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified “good” or “poor” for freezing. *Animal Reproduction Science*, v.125, p.112-118, 2011.

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

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

KARESKOSKI, A.M.;REILAS, T.;SANKARI, S.;ANDERSSON, M.; GUVENC, K.; KATILA, T. Alkaline and acid phosphatase, b-glucuronidase and electrolyte levels in fractionated stallion ejaculates. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.369-374, 2010.

LOOMIS, P. R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: Annual Convention Of American Association Of Equine Practioners, 38., 1992. Proceedings..., 1992. p.629-647.

LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 22, p.663-676, 2006.

LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; THOMPSON, J.A.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, v.63, p.1584-1591, 2005.

MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA, J.A.; MELO, C.M.; MAZIERO, R.R. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science,* v.127, p.197-201, 2011.

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

PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.G.; DELL'AQUA, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science,* v.107, p.293-301,2008.

PESCH, S.; BERGMANN, M.;BOSTEDT,H. Determination of some enzymes and macro and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology*, v.66, p.307-313, 2006.

RAMIRES-NETO, C.; MONTEIRO, G.A.; SOARES, R.F.; PEDRAZZI, C.; DELL`AQUA, J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, p.40-43, 2013.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; KVIST, U.; ERNERUDH, J.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Seminal Plasma Proteins: What role do they play? *American Journal of Reproductive Immunology*, v66 (sup.1), p.11-22, 2011.

SAS Institute. SAS/STAT User's Guide. Version 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC., 2011.

Capítulo 4

CONCLUSÕES

Garanhões sensíveis à congelação espermática apresentam maior susceptibilidade ao estresse oxidativo e consequentemente à fragmentação DNA espermático.

Diferenças encontradas nas características espermáticas entre as raças MM e QM podem estar relacionada à diversidade entre indivíduos e não ao fator raça.

O plasma seminal exerce participação distinta e particular em cada indivíduo, conferindo proteção às células espermáticas de animais good coolers e influenciando de forma negativa na qualidade espermática de animais sensíveis à refrigeração.