

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

JANISLENE MACH TRENTIN

TAMPÕES E ANTIOXIDANTES NA QUALIDADE DO SÊMEN DE PÔNEIS

PORTO ALEGRE, RS

2018

JANISLENE MACH TRENTIN

TAMPÕES E ANTIOXIDANTES NA QUALIDADE DO SÊMEN DE PÔNEIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Animal: Equinos na área de Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^a Dra Mara Iolanda Batistella Rubin

PORTO ALEGRE, RS

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Trentin, Janislene Mach
Tampões e antioxidantes na qualidade do sêmen de
pôneis / Janislene Mach Trentin. -- 2018.
86 f.
Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin.

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

1. espermatozoide. 2. equino. 3. viabilidade . 4.
DHA. I. Rubin, Mara Iolanda Batistella, orient. II.
Título.

JANISLENE MACH TRENTIN

TAMPÕES E ANTIOXIDANTES NA QUALIDADE DO SÊMEN DE PÔNEIS

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Animal: Equinos na área de Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^ª Dra Mara Iolanda Batistella Rubin

Porto Alegre, 23 de abril de 2018.

Prof^ª. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof^ª. Dra. Adriana Pires Neves
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky
Universidade Luterana do Brasil - ULBRA
Membro da Comissão

Prof. Dr. Ricardo Pozzobon
Universidade Federal de Santa Maria - UFSM
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

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

À Professora e orientadora Mara Iolanda Batistella Rubin pela oportunidade e ensinamentos transmitidos;

Aos meus colegas de Pós-Graduação Ana Paula Martini, Eliana Burtet Parmeggiani, Fabiano Trevisan da Rocha, Prof^o Gilson Antonio Pessoa, Luiz Augusto Machado Centeno, Mariani Farias Fiorenza, Ricardo Olimpio Schenatto e Romulo Oliveira Fernandes da Silva pelo auxílio e incentivo no desenvolvimento dos experimentos, amizade, além de contribuir em meu crescimento profissional;

Aos estagiários do EMBRYOLAB - UFSM que auxiliaram durante a realização dos meus experimentos pela colaboração e amizade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de fomento concedida;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Doutorado Sanduíche – PSDE concedida;

À meu pai Clademir Lovis Trentin, minha mãe Izaltina Mach Trentin e minha irmã Glaucia Mach Trentin pelo apoio incondicional;

À Ricardo Varaschini por ser meu companheiro de todas as horas.

Muito obrigada!

RESUMO

TAMPÕES E ANTIOXIDANTES NA QUALIDADE DO SÊMEN DE PÔNEIS

Autora: Janislene Mach Trentin

Orientadora: Mara Iolanda Batistella Rubin

A inseminação artificial é utilizada como uma importante ferramenta para o melhoramento reprodutivo, tanto com sêmen resfriado ou congelado. O primeiro experimento teve como objetivo identificar um tampão de pH para resfriamento de sêmen de pôneis por 48 horas a 5°C e 15°C. O efeito de cinco tampões (TES (ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico), PIPES (ácido piperaxín-N,N'-bis(2-etanosulfônico)), BES (ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico), MES (ácido 4-morfolinoetanosulfônico) e HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico)) foi avaliado em um diluente composto de leite em pó desnatado e glicose. Os testes do diluente com os tampões BES, MES e TES foram conduzidos com o sêmen fresco de oito pôneis e no sêmen resfriado por 48 h a 15°C. Uma amostra de cada grupo foi utilizada para análise da motilidade, pH, osmolaridade, teste hiposmótico, atividade mitocondrial (MTT) e integridade de membrana através das sondas fluorescentes. O pH e a osmolaridade dos diluentes sem o sêmen também foram avaliados. Os dados foram analisados por análise de variância e pelo teste de Tukey, quando $P < 0.05$ foi significativo. A osmolaridade do sêmen diluído não variou entre diluentes e foi para o BES 350.91 ± 11.24 mOsm, MES 350.41 ± 11.76 mOsm e TES 350 ± 12.96 mOsm. O pH do sêmen após diluição nos respectivos diluentes variou entre as horas avaliadas ($P < 0.05$) e não variou com o passar do tempo o que evidencia o efeito tamponante dos diluentes. A osmolaridade dos diluentes foi similar entre os tampões BES (366 ± 5.47 mOsm), MES (370 ± 6.12 mOsm) ou TES (371 ± 5.47 mOsm) a fresco e sem adição de sêmen. Já o pH variou ($P < 0.05$) de acordo com o tampão. No experimento a 5°C ocorreu decréscimo na porcentagem de motilidade total, progressiva e local do sêmen resfriado após 24 h e 48 h comparado a avaliação a fresco em todos os grupos. No entanto, a porcentagem de espermatozoides móveis a fresco, 24 h e 48 h a 5°C entre tratamentos foi similar. A porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico, e com atividade mitocondrial não diferiu entre tratamentos. No experimento a 15°C o vigor e motilidade total, progressiva e local foram similares entre os tampões BES, MES e TES em cada período avaliado. A osmolaridade do sêmen diluído não variou entre diluentes e foi para o BES 360.93 ± 10.52

mOsm, MES 361.47 ± 6.79 mOsm e TES 361.56 ± 7.68 mOsm. Devido as características individuais de cada tampão o pH do sêmen diluído variou entre os diluentes com os tampões utilizados. A porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico, com atividade mitocondrial e membrana intacta observada com CFDA e PI não diferiu entre tratamentos. Evidenciou-se que tanto BES, MES ou TES podem ser utilizados no armazenamento e transporte do sêmen de pôneis durante 48 h a 5°C ou 15°C. O segundo experimento teve como objetivo foi avaliar a influência da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados sobre a qualidade de sêmen de pôneis da raça Brasileira a fresco e após congelamento. Oito pôneis receberam sua dieta convencional não suplementada (grupo controle) ou dieta convencional e 70 g de farinha de alga *Schizochytrium sp* rica em DHA (grupo PUFA). O efeito da Vitamina E (1 mM, DL- α -tocoferol), adicionada ao diluente de congelamento para sêmen também foi avaliado sobre a qualidade seminal, antes e após o congelamento do sêmen. O sêmen foi coletado a cada 15 dias durante 60 dias. Os garanhões tratados passaram a controle e vice-versa após um intervalo de sessenta dias. O sêmen foi avaliado a fresco e após o congelamento. Motilidade e vigor foram avaliados a fresco. Após o descongelamento motilidade, funcionalidade de membrana, integridade de membrana e análise computadorizada da motilidade foram avaliados. Os valores médios para os parâmetros avaliados a fresco no grupo PUFA e controle foram similares. Os valores médios da motilidade total, progressiva e local, hiposmótico, CFDA/PI e análise computadorizada de sêmen suplementados com DHA e o grupo controle pós-descongelamento não diferiram. A associação da suplementação de DHA e Vitamina E adicionada ao diluente não potencializou a capacidade antioxidante do diluente durante o congelamento. A associação da suplementação de DHA e Vitamina E adicionada ao diluente resultou em diminuição da motilidade total e progressiva comparada ao grupo não suplementado (controle). A suplementação de 70 g de farinha de alga *Schizochytrium sp* rica em DHA e ou a inclusão de 1 mM de vitamina E ao diluente de congelamento de sêmen em pôneis da raça Brasileira não foi eficiente para promover melhoria na viabilidade seminal após a coleta ou mesmo após o congelamento.

Palavras-chave: espermatozoide, equino, viabilidade, DHA

ABSTRACT

BUFFERS AND ANTIOXIDANTS IN THE SEMEN QUALITY OF PONY STALLIONS

Author: Janislene Mach Trentin

Advisor: Mara Iolanda Batistella Rubin

Artificial insemination with cooled and frozen semen is an important tool for breeding industry. The first experiment aimed to identify a pH buffer for cooling semen of ponies for 48 h at 5°C and 15°C. The effect of five buffers (TES (N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethanesulfonic acid), PIPES (piperazin-N, N'-bis (2-ethanesulfonic acid)), BES (N, N-Bis (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid))) was evaluated in an extender composed of skim milk powder and glucose. Analysis with the BES, MES and TES buffers were performed in fresh semen of eight ponies and in cooled semen for 48 h at 15°C. A sample from each group was used for analysis of motility, pH, osmolarity, hyposmotic test, mitochondrial activity (MTT) and membrane integrity through fluorescent probes. The pH and osmolarity of the extenders without semen were also evaluated. Data were assessed by analysis of variance and Tukey's test, when $P < 0.05$ was considered significant. Osmolarity of the diluted semen did not differ between extenders and was for BES 350.91 ± 11.24 mOsm, MES 350.41 ± 11.76 mOsm and TES 350 ± 12.96 mOsm. The pH of the semen after dilution in the respective extenders varied between the hours ($P < 0.05$) and did not change over time as evidenced by the buffering effect of the extenders. Extender osmolarity was similar between BES (366 ± 5.47 mOsm), MES (370 ± 6.12 mOsm) or TES (371 ± 5.47 mOsm) buffers after dilution and without addition of semen. The pH varied ($P < 0.05$) according to the buffer. In the experiment at 5°C all treatments showed a decrease in the percentage of total, progressive and local motility of the cooled semen after 24 h and 48 h compared to the fresh. However, in the percentage of motile sperm to fresh, 24 h and 48 h at 5°C between treatments was similar. Percentage of spermatozoa reactive to the hyposmotic test, and with mitochondrial activity did not differ between treatments. In the experiment at 15°C total, progressive and local vigor and motility were similar between BES, MES and TES buffers in each period. Osmolarity of the diluted semen did not differ between extenders and was for BES 360.93 ± 10.52 mOsm, MES 361.47 ± 6.79 mOsm and TES 361.56 ± 7.68 mOsm. Due to the individual characteristics of each buffer, diluted semen pH varied between the extenders with the buffers used. Percentage of spermatozoa reactive to the hyposmotic test, with mitochondrial

activity and intact membrane observed with CFDA and PI did not differ between treatments. We concluded that BES, MES or TES can be used in the storage and transport of ponies semen for 48 h at 5°C or 15°C. The second experiment aimed to evaluate the influence of polyunsaturated fatty acid supplementation in the fresh and after freezing semen of Brazilian ponies. Eight ponies received their conventional diet (control group) or conventional diet and 70 g of DHA-rich *Schizochytrium sp* algae meal (PUFA group). The effect of Vitamin E (1 mM, DL- α -tocopherol) added to the freezing diluent for semen was also evaluated on seminal quality, before and after freezing. Semen was collected every 15 days during 60 days. Stallions were reversed in treatments after an interval of sixty days. Semen was evaluated fresh and after freezing. Motility and vigor were estimated in the fresh semen. After thawing motility, membrane functionality, membrane integrity and computerized motility analysis were evaluated. Mean values for fresh parameters evaluated in the PUFA and control groups were similar. Mean values of total, progressive and local motility, hyposmotic, CFDA/PI and computerized analysis of semen supplemented with DHA and post-thaw control group did not differ. The combination of DHA and Vitamin E supplementation added to the diluent did not potentiate the antioxidant capacity of the diluent during freezing and resulted in decreased total and progressive motility compared to the non-supplemented group. Supplementation of 70 g of DHA-rich microalgae *Schizochytrium sp* and the addition of 1 mM vitamin E to the semen freezing diluent in Brazilian ponies was not efficient to promote improvement in seminal viability after collection or even after freezing.

Keywords: sperm, equine, viability, DHA

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Desenho experimental da dieta alimentar convencional não suplementada (grupo controle) ou a dieta alimentar convencional e a suplementação com farinha de alga <i>Schizochytrium sp</i> rica em DHA (Grupo PUFA) fornecida uma vez ao dia por 60 dias para pôneis da raça Brasileira.....	61
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1 - Vigor, motilidade total, progressiva e local de sêmen resfriado por 48 h a 5°C de pôneis da raça Brasileira em diluente com ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).....43

TABELA 2 - Teste hiposmótico e atividade mitocondrial de sêmen resfriado por 48 h a 5°C de pôneis da raça Brasileira em diluente com ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).....44

TABELA 3 – Determinação do pH de sêmen diluído e resfriado por 48 h a 5°C de pôneis da raça Brasileira acrescido de ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).....45

TABELA 4 – Determinação do pH dos diluentes com ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES) por 48 h de resfriamento a 5°C.....45

TABELA 5 - Vigor, motilidade total, progressiva e local de sêmen resfriado a 15°C por 48 h de pôneis da raça Brasileira submetidos a diluente com tampão de ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).....47

TABELA 6 – Determinação do pH do sêmen resfriado por 48 h a 15°C de pôneis da raça Brasileira em diluente com ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).....48

TABELA 7 - Teste hiposmótico, atividade mitocondrial e integridade de membrana de sêmen resfriado de pôneis da raça Brasileira por 48 h a 15°C em diluente com ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).....48

ARTIGO 2

TABELA 1 - Volume, concentração, pH, vigor motilidade total, progressiva e local de sêmen de pôneis da raça Brasileira suplementados com ácido docosahexaenóico (DHA; médias \pm desvio padrão).....65

TABELA 2 - Motilidade total, progressiva e local, funcionalidade da membrana plasmática através do teste hiposmótico, integridade da membrana plasmática através de coloração com CFDA/PI e análise computadorizada de sêmen pós-descongelamento de pôneis da raça Brasileira suplementados com ácido docosahexaenóico (médias \pm desvio padrão).....65

TABELA 3 - Motilidade total, progressiva e local, funcionalidade da membrana plasmática através do teste hiposmótico, integridade da membrana plasmática através de coloração com CFDA/PI e análise computadorizada de sêmen de pôneis da raça Brasileira suplementados com DHA pós-descongelamento e com 1 mM de Vitamina E adicionada ao diluente de congelamento (médias \pm desvio padrão).....66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato

Ca 2+ – Íon cálcio

CASA – Sistema automatizado de análise seminal

CFDA – Diacetato 6-Carboxifluoresceína

DHA – Ácido docosahexaenóico

DPA – Ácido docosapentaenóico

EPA – Ácido eicosapentaenóico

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

g – Gramas

h – Horas

IP – Iodeto de propídio

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HOST – Funcionalidade da membrana plasmática: teste hiposmótico

IA – Inseminação artificial

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

Mm – Milimolar

mOsm – Miliosmóis

MP – Motilidade progressiva

MTT – Atividade mitocondrial

nm – Nanômetro

P – Nível de significância

pH – Potencial de Hidrogênio

PUFAs – ácidos graxos poli-insaturados

sptz – Espermatozoides

g – Força G

% – Porcentagem

°C – Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Resfriamento	16
2.1.1 Diluentes para sêmen equino	16
2.1.2 Tampões para diluentes de sêmen.....	17
2.2 Criopreservação espermática	18
2.2.1 Membrana plasmática.....	22
2.2.2 Suplementação	23
2.2.3 Vitamina E	25
2.3 Avaliação do sêmen	26
2.3.1 Avaliação macroscópica do sêmen	28
2.3.2 Motilidade espermática	28
2.3.3 Avaliação computadorizada da motilidade espermática	29
2.3.4 Avaliação da membrana plasmática.....	30
2.3.5 Atividade mitocondrial.....	31
2.3.6 Morfologia espermática.....	31
3 ARTIGO 1.....	33
4 ARTIGO 2.....	56
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial na espécie equina pode ser realizada com sêmen fresco, resfriado ou congelado. O uso de sêmen refrigerado ou congelado oferece inúmeras vantagens para os criadores e, comprovando este fato nos últimos anos, grande parte das associações de raças equinas permitiram o uso dessa biotecnologia. A refrigeração do sêmen tem sido estudada porque há grande interesse na manutenção do potencial fertilizante do sêmen equino por períodos prolongados (BATELLIER et al., 2001).

Éguas inseminadas na própria fazenda com sêmen fresco tem a probabilidade 2,5 maior de conceberem do que éguas inseminadas com sêmen resfriado ou congelado fora da fazenda (BRINKERHOFF et al., 2010). O uso de um diluente adequado é essencial para a proteção do espermatozoide equino durante seu armazenamento (BATELLIER et al., 1997), uma vez que um diluente eficiente tampona alterações de pH do sêmen, mantém a osmolaridade da amostra, proporciona fontes de energia e de proteína para o metabolismo dos espermatozoides, estabiliza a membrana durante mudanças na temperatura, reduz os efeitos prejudiciais do plasma seminal, confere propriedades antibacterianas por meio dos antibióticos (AURICH e SPERGSE, 2007) e mantém a integridade da cromatina (LOVE et al., 2002).

Para avaliar a qualidade do diluente devem ser aferidas a pressão osmótica e o pH (DARENIUS, 1998). O pH do ejaculado equino varia entre 6,8 a 7,6. O pH de diluentes nesta faixa é tolerado sem efeitos prejudiciais. Os diluentes devem tamponar o pH do sêmen diluído em resposta a produção de substâncias metabólicas pelos espermatozoides, ou bactérias contaminantes (AURICH, 2011).

Em 1975, a formulação de um diluente a base de leite em pó desnatado e glicose foi publicada por Kenney e colaboradores. Neste diluente, o bicarbonato de sódio era o responsável pelo tamponamento da solução que também continha antibióticos.

Fatores tais como a concentração ou a fonte de plasma seminal no sêmen armazenado (LOVE et al., 2005; LOVE et al., 2010) contribuem para diminuir a qualidade dos espermatozoides ao longo do tempo. Além disso, a redução de substratos metabolizáveis, ou o aumento de resíduos metabólicos no sêmen armazenado também pode contribuir para diminuição da qualidade espermática (LOVE et al., 2012). Geralmente, durante o armazenamento, espermatozoides e bactérias contaminantes produzem metabólitos que podem reduzir o pH do

diluyente, reduzindo o metabolismo e a motilidade espermática (YÁNIZ et al., 2011). Anteriormente, Rasul et al. (2000) já haviam recomendado o uso de tampões *zwiteriônicos* para evitar a ocorrência dessas alterações, com o objetivo de diminuir a alteração no pH durante o resfriamento, o que pode ser crucial na preservação do sêmen.

Atualmente, a criopreservação tornou-se uma área de maior interesse para a indústria equina, especialmente para os ganhos zootecnicamente superiores, pois permite o transporte a longa distância do sêmen, o controle de doenças sexualmente transmissíveis e, acima de tudo, a preservação do material genético indefinidamente. No entanto, esta tecnologia ainda está em desenvolvimento e causa alterações físicas e químicas à integridade estrutural, bioquímica e biofísica dos espermatozoides, resultando em menores taxas de fertilidade (MAZIERO et al., 2013). Em geral, assume-se que 40-50% dos espermatozoides não sobrevivem ao processo de congelamento e descongelamento (WATSON, 2000). Vários fatores foram relacionados as alterações causadas pelo congelamento como: transição de fase na membrana, estresse oxidativo, apoptose e capacitação, estresse mecânico nas membranas devido ao estresse osmótico e mudanças de temperatura durante o processo de congelamento e descongelamento, que contribuem para a morte de espermatozoide, ou para a sua vida reduzida (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009).

Um método popular para melhorar a saúde dos ganhos é o uso de suplementos adicionados a dieta e, assim, também melhorar a qualidade do sêmen. Como os cavalos não podem sintetizar ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados, esses compostos devem ser adicionados às suas dietas (BRINSKO et al., 2005).

Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de cinco tampões (TES, PIPES, BES, MES e HEPES) sobre a viabilidade espermática, o pH e osmolaridade de um diluyente a base de leite em pó desnatado e glicose imediatamente após a exposição do sêmen equino fresco e refrigerado a 5° e 15°C por 24 e 48 horas. Espera-se com esta pesquisa identificar um tampão adequado para manutenção do sêmen de pôneis resfriado por 48 horas, bem como avaliar o efeito de um suplemento alimentar rico em ácido docosahexaenóico (DHA) extraído de algas marinhas e o efeito da Vitamina E adicionado ao diluyente para congelamento, sobre a qualidade seminal e o estresse oxidativo em pôneis da raça Brasileira antes e após o congelamento do sêmen.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resfriamento

Na espécie equina, a seleção animal não é realizada em função da performance reprodutiva. Com isso, a qualidade do sêmen é o maior determinante no sucesso nos programas de reprodução. A inseminação artificial de éguas com sêmen resfriado tornou-se um procedimento de rotina na indústria de criação equina devido às boas taxas de fertilidade e custos relativamente baixos (CONTRI et al., 2010). O sêmen resfriado pode ser mantido armazenado por aproximadamente 24 h sem perdas significativas na sua capacidade fertilizante comparado ao sêmen fresco (MAGISTRINI et al., 1996). Porém, as taxas de prenhez obtidas usando sêmen resfriado diminuem após 48 h de armazenamento (AURICH, 2008). Esse decréscimo na fertilidade foi atribuído as mudanças na membrana espermática (AURICH, 2005) e também a peroxidação lipídica, fosforilação oxidativa, fragmentação da cromatina e metilação de citosina do DNA que contribuem para lesar o espermatozoide durante o resfriamento e transporte (KRAKOWSKI et al., 2013; GIBB et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2017).

2.1.1 Diluentes para sêmen equino

Vários diluentes foram desenvolvidos para serem utilizados no resfriamento de sêmen e estão disponíveis comercialmente. A grande maioria mantém motilidade considerável por 24 h de resfriamento. O resfriamento do sêmen tem como vantagens a redução do transporte de animais, despesas de hospedagem e a redução no risco de transmissão de doenças (LOOMIS e GRAHAM, 2008).

Os diluentes de sêmen utilizados para diluição e transporte de sêmen refrigerado possuem em sua composição principalmente leite desnatado ou gema de ovo. Os componentes ativos envolvidos na proteção do espermatozoide pelo leite são micelas de caseína, que interagem com proteínas plasmáticas de membrana e protegem contra a remoção de fosfolípidios e colesterol da membrana plasmática (BERGERON e MANJUNATH, 2006). A gema de ovo, em combinação com outros componentes do diluente, pode auxiliar os espermatozoides a resistir ao choque térmico induzido pelo frio (AMIRAT et al., 2004) e esta ação protetora é atribuída

principalmente às lipoproteínas de baixa densidade (MOUSSA et al., 2002). A diluição do sêmen também minimiza os efeitos da contaminação por urina sobre a motilidade espermática (GRIGGERS et al., 2001).

2.1.2 Tampões para diluentes de sêmen

O HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico) é um tampão *zwitteriônico* orgânico, também conhecido como um tampão de Good, que é uma molécula de taurina modificada. O HEPES pode ser utilizado como um ácido livre, ou conjugado com vários sais (WILL et al., 2011). Durante a sua formulação inicial, o HEPES foi um dos melhores tampões para uso no crescimento de várias linhagens de células e, em relação ao desempenho de vários ensaios biológicos (GOOD et al., 1966; FERGUSON et al., 1980). Da mesma forma, já ficou bem evidenciado que o HEPES é um tampão seguro e eficaz quando comparado a outros tampões para armazenamento de espermatozoides de várias espécies e em várias temperaturas (CRABO et al., 1972; MOLINIA et al., 1994; MOLINIA et al., 1996). No estudo de CRABO et al., (1972) desenvolvido com carneiros, o HEPES foi utilizado para a manutenção da integridade da membrana de espermatozoides armazenados a 5°C e resultou na menor quantidade de liberação de glutamina a partir de oxaloacetato transaminase dos espermatozoides. Este efeito não foi significativamente diferente do ácido N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), do ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES) e do ácido piperaxín-N,N'-bis(2-etanosulfônico) (PIPES), mas foi significativamente melhor do que ácido 3-Morfolinopropanosulfônico (MOPS), do ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES) e da Tricina.

O TES também é um dos tampões originalmente descritos por Good et al. (1966) e também pode ser obtido como um ácido livre ou conjugado de sódio. Este tampão é utilizado amplamente para ensaios moleculares e sua maior utilização tem sido para armazenar espermatozoides, como componente de um tampão combinado com TRIS (WILL et al., 2011). Por si só, o TES foi utilizado com sucesso para a criopreservação de espermatozoides ovinos e resultou em maior motilidade pós-descongelamento do que os diluentes-controles em que o sêmen foi congelados em Tris-citrato. Os resultados foram similares em comparação com cinco outros meios tamponados com *zwitterions* (HEPES, HEPES:Tris, MES:Tris, PIPES, PIPES:Tris) (MOLINIA et al., 1994). O TES foi considerado como um dos dois melhores tampões em

diluentes para armazenamento ou congelamento de espermatozoides ovinos. Espermatozoides expostos a TES produziram umas das mais altas taxas de motilidade espermática após o armazenamento a 5°C e níveis mais baixos de liberação de glutamina a partir de oxaloacetato transaminase em comparação com outros tampões estudados (CRABO et al., 1972).

O PIPES também é um tampão de ácido etanossulfônico desenvolvido por Good et al. na década de 1960. Este tampão já foi empregado em meios para criopreservação de espermatozoides de caprinos (CRABO et al., 1972), de ovinos (MOLINIA et al., 1996) e também na maturação *in vitro* de óocitos de ratos (DOWNS e MASTROPOLO, 1997).

O ácido 4-morfolinoetanossulfônico (MES) também é um tampão descrito na pesquisa de Good et al. (1966) e possui pKa de 5,97 a 37°C. O MES foi utilizado como tampão em diluentes para criopreservação de espermatozoides de carneiro e resultou em motilidade espermática semelhante após armazenamento a 37°C em comparação com outros seis tampões *zwitteriônicos*, porém apresentou motilidade espermática significativamente menor quando utilizado a 5°C em comparação com o BES, MOPS, TES, HEPES e Tricina (CRABO et al., 1972). O uso do MES na concentração de 50 mM foi igual ao HEPES e ambos foram superiores entre os tampões testados (MES, HEPES, TES, Tris e fosfato) no armazenamento de espermatozoides de touro a 5 ou 37°C (JONES e FOOTE, 1972).

O ácido N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanossulfônico (BES) é uma molécula de taurina modificada e também é um dos tampões originais descritos por Good et al. (1966). Com um pKa de 6,90 a 37°C, o tampão foi empregado em diluentes para criopreservação de espermatozoides de carneiros sendo considerado um dos cinco melhores tampões na manutenção da motilidade após o armazenamento a 5°C, similar ao MOPS, TES, HEPES e Tricina (CRABO et al., 1972). Além disso, o BES foi um dos três principais tampões utilizados com sucesso para o armazenamento e congelamento de espermatozoides de peru e de touro (BROWN et al., 1972; GRAHAM et al., 1972).

2.2 Criopreservação espermática

Nos últimos anos, os estudos sobre as tecnologias de criopreservação de sêmen equino aumentaram, principalmente as que se concentram na compreensão dos danos aos quais os espermatozoides são submetidos durante o congelamento e descongelamento. No entanto, nesta

espécie, o método de criopreservação é complexo e, globalmente, a maior parte do sêmen desses animais tem pouca capacidade de criopreservação (BARBAS e MASCARENHAS, 2009). Um dos fatores que contribuem para esse fenômeno é que os garanhões são selecionados para reprodução com base em seu pedigree e desempenho atlético (GARCÍA et al., 2011). O sêmen congelado é uma biotecnologia indispensável para o comércio de material genético equino e está se tornando um grande componente da indústria equina. Contudo a disseminação dessa tecnologia ainda é atrasada devido a estas desvantagens (PEÑA et al., 2011).

A resposta dos espermatozoides a mudanças repentinas de temperatura é diferente entre raças equinas e também entre indivíduos da mesma raça (LOOMIS e GRAHAM, 2008). Isso ocorre devido a diferenças específicas no metabolismo seminal entre indivíduos, o que torna o desenvolvimento de protocolos de refrigeração e congelamento personalizados um processo caro e complexo. Além disso, a mortalidade dos espermatozoides durante o processo é a principal desvantagem, particularmente devido à falta de padronização dos procedimentos e a variação de garanhão-garanhão (RODRIGUEZ et al., 2015, LOOMIS e GRAHAM, 2008).

Vidament (2005) constatou que 30% dos garanhões tinham sêmen com congelabilidade “boa”, 40% dos garanhões tiveram sêmen que congelou de “forma satisfatória” e 30% dos garanhões tiveram sêmen pós congelamento insatisfatório. Estima-se que após o congelamento e descongelamento do sêmen equino ocorra decréscimo no número de células intactas, diminuindo a taxa de espermatozoides viáveis em aproximadamente 50% (WATSON, 2000). Com isso, o período de vida da população sobrevivente é reduzido (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008), o que, ao exigir um monitoramento frequente e intensivo das éguas para o melhor tempo de inseminação artificial (IA), aumenta os custos desta técnica. A inseminação com sêmen criopreservado resulta em menor fertilidade em comparação com o sêmen fresco, mas há aumento no interesse e demanda de sêmen equino criopreservado pelas principais associações criadoras, pois durante a estação reprodutiva as doses de sêmen já estão à disposição para serem utilizadas, não sendo necessário esperar pela coleta, transporte e envio como no sêmen resfriado (ALBRIZIO et al., 2015).

O congelamento e descongelamento expõe os espermatozoides a variações extremas de temperatura e osmolaridade. A criopreservação impõe mudanças osmóticas dramáticas aos espermatozoides e particularmente às mitocôndrias (TAPIA et al., 2012), levando a sua disfunção e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ORTEGA-FERRUSOLA et al.,

2008; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2010), o que altera a homeostase de EROs e levando a senescência acelerada dos espermatozoides sobreviventes (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2008, ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009; CASELLES et al., 2014).

Com as taxas de congelamento rápido atualmente utilizadas, a formação intracelular de cristais de gelo não ocorre no espermatozoide equino e os danos ocorridos durante o processo são devido ao desequilíbrio osmótico (MORRIS et al., 2007). As membranas espermáticas também sofrem uma transição de fase de líquida para estado cristalino durante o congelamento (AMANN e PICKETT, 1987). O estresse físico é uma das principais causas de danos à membrana plasmática dos espermatozoides (PEÑA et al., 2011). A fluidez da membrana afeta o grau de dano. A modulação da relação colesterol-fosfolípídeo altera a temperatura em que ocorre a transição de fase e mantém a fluidez da membrana a temperaturas mais baixas (MOORE et al., 2005).

A razão pela qual algumas espécies são mais suscetíveis as mudanças causadas pelo resfriamento e congelamento do que outras estão diretamente relacionadas à composição lipídica da membrana celular (AVANZI et al., 2001). As membranas plasmáticas de espermatozoides de mamíferos contêm concentrações elevadas de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (C22). O sêmen dos animais domésticos possui altos níveis de ácido graxos poli-insaturados (PUFAs) em particular, ácido docosahexaenóico (DHA, ômega 3) e ácido docosapentaenóico (DPA, ômega 6). O sêmen de cavalos contém alto nível de DPA. Estudos em caprinos demonstraram que elevada taxa de DHA:DPA no sêmen resulta em melhoria da fertilidade, enquanto que altos níveis de DPA relativo ao DHA reduz a fertilidade (PENNY et al., 2000; MALDJIAN et al., 2003).

Sabe-se que todas as células, incluindo os espermatozoides, produzem espécies reativas de oxigênio (EROs). Em condições fisiológicas estes produtos do metabolismo são inativados por antioxidantes presentes nas secreções do trato reprodutivo ou sua presença é necessária para a capacitação espermática (LECLERC et al., 1997). Porém, quando o sêmen é armazenado para uso na inseminação artificial, danos aos espermatozoides podem ocorrer. Johannisson et al. (2014) demonstraram que a porcentagem de células espermáticas positivas para EROs e a qualidade espermática variam consideravelmente entre ganhões e inclusive entre ejaculados de um mesmo ganhão.

A susceptibilidade dos espermatozoides ao dano causado pelo estresse oxidativo é devido a grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) na membrana fosfolípida, capacidade antioxidante limitada da célula e a grande habilidade dos espermatozoides para gerar EROs, embora indispensável, em níveis fisiológicos, para uma adequada funcionalidade da célula espermática (SHARMA e AGARWAL, 1996; AGARWAL et al., 2006; BANSAL e BILASPURI, 2011). O colesterol aumenta a estabilidade da membrana celular, diminuindo a temperatura na qual a membrana passa da fase fluida para a fase gelatinosa (HOLT, 2000, KIRK et al., 2001). Os fosfolipídios proporcionam flexibilidade a membrana, dependendo da sua composição de ácidos graxos, e são importantes para a permeabilidade e funcionalidade da célula (GARCIA et al., 2011).

Nos cavalos, a proporção fisiológica do colesterol em relação aos fosfolipídios na membrana plasmática do espermatozoide pode prejudicar a sua capacidade de passar por um processo de resfriamento e especialmente congelamento com êxito (LOOMIS e GRAHAM, 2008). Uma vez que a proporção de colesterol para fosfolipídios não pode ser alterada no espermatozoide (SCHMID-LAUSIGK e AURICH, 2014), pois é determinada geneticamente para cada espécie e cada indivíduo, os estudos se concentraram no efeito da adição de ácidos graxos poli-insaturados à dieta para aumentar sua proporção em relação aos fosfolipídios da membrana espermática, melhorando sua fluidez e resistência ao estresse térmico (BRINSKO et al., 2005; ELHORDOY et al., 2008; GRADY et al., 2009).

Em 2005, Brinsko e colaboradores testaram o efeito da suplementação em sêmen fresco, resfriado e congelado e concluíram que garanhões altamente férteis ou aqueles que produzem espermatozoides que toleram o resfriamento não necessitam ser suplementados. Já os garanhões de fertilidade marginal, bem como aqueles cujos espermatozoides têm baixa tolerância ao resfriamento e congelamento seriam cavalos com possibilidade de se beneficiar da suplementação com DHA, pois a qualidade do sêmen pode melhorar suficientemente e torna-los comercialmente aceitáveis para resfriamento e congelamento. O estudo desenvolvido por Gholami et al. (2010) que versa sobre a suplementação de DHA ou seus precursores à alimentação melhorou a qualidade *in vitro* e a motilidade do sêmen fresco em touros da raça Holandesa, porém este efeito não foi tão pronunciado após o congelamento. Este suplemento era composto de óleo de salmão, farelo de trigo, extrato da semente de palma e vitamina E.

Em garanhões a suplementação com DHA gerou influência positiva sobre a motilidade do sêmen fresco, resfriado e após descongelamento (HARRIS et al., 2005). Nos coelhos, a associação de ácidos graxos ômega 3 na dieta com vitaminas E e C melhorou a qualidade do sêmen durante o armazenamento do sêmen (CASTELLINI et al., 2003). Em búfalos, dietas contendo PUFAs de cadeia longa (fornecido pelo óleo de girassol) melhorou a qualidade dos espermatozoides pós-descongelamento (ADEEL et al., 2009). Em contraste, a suplementação da dieta com óleo de fígado de bacalhau não teve influência na congelabilidade do sêmen suíno (PAULENZ et al., 2005).

Uma vez que os animais não são capazes de sintetizar PUFAs a partir de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados, estes devem ser adquiridos a partir de PUFAs precursoras na sua dieta. Infelizmente, a alimentação da maioria dos cavalos é rica em precursores de ácidos graxos ômega-6, enquanto os precursores de ácidos graxos ômega-3, como o DHA, são muito baixos (BRINSKO et al., 2005).

Embora, novos avanços em protocolos de criopreservação (ECOT et al., 2000; MOORE et al., 2006; SALAZAR et al., 2011) e novos diluentes (STEPHENS et al., 2013) foram projetados para melhorar a qualidade do sêmen de equino pós-descongelamento, não existe um protocolo ideal para todos os casos.

2.2.1 Membrana plasmática

A susceptibilidade dos espermatozoides ao dano oxidativo é atribuída às diferenças individuais na composição de ácidos graxos de suas membranas, capacidade antioxidante limitada e capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) que por sua vez são responsáveis pela manutenção de processos fisiológicos no espermatozoide (por exemplo, capacitação, reação de acrossoma, hiperativação e fusão de espermatozoide-oócito) (ALMEIDA et al., 2005; CÂMARA et al., 2011). Alguns processos fisiológicos durante a fertilização (capacitação, reação do acrossoma, fusão de espermatozoide e óvulo) estão associados a uma membrana ativa, e é impossível a ocorrência da fertilização com uma membrana fisicamente inativa. A membrana plasmática dos espermatozoides de garanhões e carneiros tem uma menor proporção de colesterol em fosfolipídios do que a membrana plasmática de espermatozoides de touros (PARKS e LYNCH, 1992).

Devido à grande importância da integridade da membrana plasmática para a fertilização, vários métodos como testes bioquímicos, coloração supravital ou microscopia eletrônica tem sido utilizados para avaliar a membrana plasmática, no entanto muitas vezes podem ser considerados demorados, caros e avaliam somente o status e não a funcionalidade da membrana. Alguns métodos simples podem ser empregados para avaliar a integridade da membrana plasmática como a coloração supravital (eosina/negrosina) (DOTT e FOSTER, 1972) e a coloração com iodeto de propídio (PI) e diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) (HARRISON e VICKERS, 1990) e a funcionalidade da membrana pode ser avaliada através do teste hiposmótico (HOST) (MELO e HENRY, 1999).

2.2.2 Suplementação

O uso de sêmen equino resfriado e congelado tornou-se bastante popular. No entanto, os espermatozoides de alguns garanhões são suscetíveis ao choque frio. Assim, existe a necessidade de um produto com capacidade de alterar o espermatozoide para que eles possam suportar o estresse de resfriamento e congelamento e, assim, melhorar as taxas de prenhez. Estudos desenvolvidos com ácidos graxos omega-3, particularmente o ácido docosahexaenóico (DHA), demonstraram que os mesmos conferem múltiplos benefícios para a saúde em humanos, animais de laboratório e cavalos (HESS et al., 2012).

Os ácidos graxos poli-insaturados tornam a membrana espermática com a fluidez necessária para os eventos relacionados à sua fusão durante o processo de fertilização. Além disso, os PUFA também alteram a temperatura na transição entre os estágios líquido e cristalino da membrana espermática, pois quanto maior a proporção na membrana espermática, maior a fluidez e o tempo em que o conteúdo celular permanecerá no estado líquido, sem a formação de cristais, o que o torna o espermatozoide mais resistente às mudanças bruscas de temperatura durante o processo de congelamento (MOORE et al., 2005; GARCIA et al., 2011).

Os ácidos graxos são compostos de cadeias de hidrocarbonetos não ramificados com um número par de carbonos e são classificados como cadeia curta (4 átomos de carbono), cadeia média (6 a 12 átomos de carbono) ou cadeia longa (14 a 22 átomos de carbono). Dependendo da presença e do número de ligações duplas na cadeia carbônica alifática da molécula, os ácidos graxos também podem ser classificados como saturados (sem ligações duplas), monoinsaturados

(uma ligação dupla) ou poli-insaturados (mais de uma ligação dupla). Os ácidos graxos poli-insaturados são ainda classificados de acordo com a posição da primeira ligação dupla quando contados a partir da extremidade metálica em ácido graxos n-3, dupla ligação posicionada entre o terceiro e quarto carbonos e n-6 com a primeira ligação dupla localizada entre o sexto e sétimo carbonos. A adição de PUFAs pode trazer benefícios consideráveis para o potencial reprodutivo. As fontes de lipídios geralmente utilizadas na dieta de cavalos incluem a soja, o girassol e o óleo de milho, ambos ricos em ômega-6 e pobres em ômega-3, como componentes principais (GURR et al., 2002).

Os animais não conseguem sintetizar PUFAs de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados assim devem adquiri-los de precursores na dieta. O intestino delgado é o local primário para a absorção de ácidos graxos de cadeia longa e gordura fornecida pela dieta (MEYER et al., 1997) e o fígado é o responsável pela sua conversão e metabolização (NEURINGER et al., 1988).

As diferentes classes de ácidos graxos causam efeitos metabólicos diferentes nos tecidos e devem estar presentes no sangue para ocorra sua incorporação. Fatores como a fonte, tempo e a concentração de ômega-3 são parâmetros que devem ser considerados para que ocorra incorporação dos ácidos. Uma vez no tecido, ácidos graxos n-6 e n-3 formam complexos lipídicos-proteicos específicos que são necessários para estruturas celulares em estágios específicos de diferenciação e desenvolvimento tecidual (NEURINGER et al. 1988). A suplementação comercial oral com óleo de arroz por 80 dias contendo PUFAs e gama-orizanol aumentou o potencial antioxidante total, maior funcionalidade e motilidade da membrana do sêmen de garanhões (ARLAS et al., 2008). Embora a incorporação de EPA e DHA tenha sido observada com a suplementação de óleo de peixe em humanos e animais, problemas com palatabilidade foram relatados. Devido a esta questão, a produção comercial de algas *Schizochytrium sp* ricas em DHA cresceu em popularidade. *Schizochytrium sp* é um organismo eucariótico heterotrófico que produz PUFAs por fermentação (LIPPMEIER et al., 2009).

A administração oral de um suplemento de ácido graxo ômega 3 de algas para éguas suscetíveis e resistentes reduziu significativamente a resposta inflamatória pós-cobertura com sêmen congelado (BRENDMUEHL et al., 2014). O suplemento dietético (suplemento contendo levedura selenizada, vitamina E e microalga rica em DHA) foi efetivo na melhora da motilidade do espermatozoide após 60 dias de fornecimento (GOEDDE et al., 2015). Suplementos dietéticos

similares de PUFAs com ou sem antioxidantes alteraram a composição lipídica dos espermatozoides e melhoraram a qualidade do sêmen em perus (ZANIBONI et al., 2006), galos (CEROLINI et al., 2006), coelhos (MOURVAKI et al., 2010) e caprinos (RADOMIL et al., 2011). Em coelhos, a suplementação dietética com óleo de linhaça sozinha aumentou a porcentagem de espermatozoides vivos, sua velocidade linear e sua capacidade de resposta às soluções hiposmóticas (MOURVAKI et al., 2010). Em garanhões, a suplementação dietética com ômega-3 PUFAs melhorou a qualidade do sêmen refrigerado e após descongelamento (BRINSKO et al., 2005).

2.2.3 Vitamina E

O estresse oxidativo é uma consequência da produção extrema de EROs e resulta no decréscimo dos níveis de ATP intracelular que inicia a peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides (ALMEIDA e BALL, 2005). Para evitar a superprodução de EROs, diversos mecanismos de defesa são acionados, incluindo os enzimáticos e antioxidantes. Acredita-se que a Vitamina E seja um dos componentes primários do sistema antioxidante dos espermatozoides (SURAI et al., 1998) e protege o espermatozoide dos EROs e da peroxidação lipídica. A suplementação com vitamina E e outros antioxidantes foi e ainda é utilizada para melhorar o mecanismo de defesa antioxidante e prevenção de danos associados a radicais livres no testículo e epidídimo (ALMEIDA e BALL, 2005; DEICHSEL et al., 2008; CONTRI et al., 2011).

Os antioxidantes adicionados a diluentes de congelamento foram utilizados com sucesso para melhorar a motilidade e a integridade da membrana no processo de criopreservação em homens, touros, carneiros, caprinos, javalis e em caninos (BUCAK et al., 2010; BANSAL e BILASPURI, 2011).

A vitamina E é um poderoso antioxidante lipofílico e existem diferentes isoformas: quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis e a mais abundante encontrada no tecido mamífero é o α -tocoferol (AITKEN e ROMAN, 2008). O α -tocoferol é vital para a manutenção da espermatogênese de mamíferos (ALMEIDA e BALL, 2005). As células dos mamíferos não sintetizam esse antioxidante e apenas o tocoferol da membrana é consumido pelo sistema oxidativo criando um radical relativamente estável (ALMEIDA e BALL, 2005).

Considera-se que a vitamina E é o principal componente do sistema antioxidante dos espermatozoides e é considerada a principal protetora de membrana contra EROs e peroxidação lipídica da membrana (AGARWAL et al., 2003; CONTRI et al., 2011). A vitamina E ou α -tocoferol é uma quebra de cadeia e não um antioxidante eliminador (DAD et al., 2006). Esta característica resulta na neutralização de radicais lipídicos; por isso oferece proteção de componentes de membrana sem influenciar a geração de EROs (MARQUES et al., 2010). Vários estudos foram realizados em mamíferos para avaliar o efeito da adição de vitamina E em diluentes para congelamento com o objetivo de melhorar a qualidade do sêmen, mas resultados inconsistentes foram observados (FRANCO et al., 2013).

A adição de vitamina E ao diluente de congelamento melhorou a qualidade pós-descongelamento, além disso, a adição de α -tocoferol reduziu significativamente a peroxidação lipídica em espermatozoides equinos (AGÜERO et al., 1995; BALL e ANTHONY, 2002). Nos espermatozoides criopreservados bovinos, a vitamina E mostrou efeito protetor sobre a integridade da membrana plasmática durante o congelamento rápido (O'FLAHERTY et al., 1997). Em um estudo em cães o tratamento com vitamina E superou os efeitos negativos sobre a qualidade do sêmen que o tratamento com dexametasona induziu (HATAMOTO et al., 2006). Pesquisas semelhantes sugerem que a suplementação dietética de vitamina E pode impactar positivamente na qualidade do sêmen e a manutenção do espermatozoide durante o armazenamento *in vitro*. De acordo com Contri et al. (2011), a suplementação dietética de selênio, zinco e vitamina E resultou em aumento dos parâmetros de motilidade, viabilidade e antioxidantes totais no sêmen fresco de garanhões. A suplementação dietética com vitamina E parece ser eficaz em limitar a peroxidação lipídica das membranas espermáticas em perus e galos (BREQUE et al., 2003).

2.3 Avaliação do sêmen

A avaliação do sêmen faz parte do exame andrológico completo para predizer a capacidade reprodutiva do garanhão. O objetivo da análise é determinar o potencial fertilizante da amostra seja esta fresca, refrigerada ou após descongelamento, usando testes rápidos e preferencialmente com baixo custo. Testes laboratoriais convencionais para avaliar a qualidade

espermática foram desenvolvidos há décadas, incluindo a avaliação do volume, concentração, morfologia e a motilidade espermática (LOVE, 2016).

A motilidade era inicialmente avaliada por um técnico qualificado em microscópio, embora agora mais frequentemente seja realizada usando análise assistida por computador. Embora uma análise conduzida dessa maneira tenha valor preditivo, a incorporação de algumas técnicas recentemente desenvolvidas pode melhorar o valor do exame. O valor do exame é baseado, em grande parte, em equipamento confiável e avaliador com experiência e bom poder de observação, no entanto mesmo quando empregados estes recursos, o valor preditivo do exame pode ser limitado (VARNER et al., 2008).

Vários métodos laboratoriais já foram criados para avaliar a eficiência do espermatozoide pois cada um deve possuir diferentes atributos necessários para fertilizar um oócito e os testes laboratoriais individuais apenas avaliam um ou alguns desses (MOCÉ e GRAHAM, 2008). O sêmen é composto por uma população heterogênea de células e muitas destas dentro da amostra são incapazes de fertilizar um oócito (HOLT e VAN LOOK, 2004; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Muitos desses espermatozoides inférteis serão eliminados pelo sistema reprodutivo da fêmea e somente uma população de espermatozoides selecionados irá chegar à tuba uterina. No entanto, durante a avaliação do sêmen estes espermatozoides constituem grande parte da amostra que está sendo avaliada (HOLT e VAN LOOK, 2004; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2006; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Apesar dos espermatozoides exibirem características semelhantes podem reagir de maneira diferente ao stress ou outras condições (PETRUNKINA et al., 2005).

Espermatozoides são células multicompartimentadas, e cada sub-compartimento deve estar intacto para que seja capaz de chegar até a tuba uterina e fertilizar o oócito (MOCÉ e GRAHAM, 2008). Portanto, é improvável que apenas uma análise laboratorial que avalie um ou alguns atributos do espermatozoide seja capaz de detectar a proporção de espermatozoide na população que contém todos os atributos necessários para fertilizar um oócito e manter o desenvolvimento embrionário (MOCÉ e GRAHAM, 2008). A predição da fertilidade ainda permanece limitada.

2.3.1 Avaliação macroscópica do sêmen

As avaliações iniciais de amostras de sêmen puro são realizadas imediatamente após a coleta. Estas incluem a coloração do ejaculado, que deve ser acinzentado próximo ao branco e que está relacionado geralmente com a concentração espermática. Qualquer alteração na coloração pode indicar anormalidades ou contaminação (JASKO, 1992). O aspecto do sêmen pode ser de aquoso a leitoso dependendo da concentração espermática. O sêmen deve ser filtrado, para remover a porção de gel do ejaculado, antes de avaliar o volume e o pH. O volume de sêmen pode ser determinado através tubos graduados ou pesando a amostra. A medida do volume do sêmen é fundamental para, em combinação com concentração de espermatozoides no ejaculado, determinar o número total de espermatozoides, a diluição que deve ser realizada e preparar a dose inseminante (MOCÉ e GRAHAM, 2008; LOVE, 2016).

2.3.2 Motilidade espermática

A motilidade espermática é o teste mais comum empregado para avaliar a qualidade espermática pois é fácil e rápido. A estimativa visual da motilidade é o método mais rotineiramente utilizado, rápido e de baixo custo porém é um método subjetivo e pode ser influenciado pela experiência do avaliador. A avaliação da motilidade espermática é considerada um teste laboratorial fundamental para avaliar a capacidade fertilizante dos espermatozoides em um ejaculado. A avaliação do sêmen não diluído ou puro fornece indicativo de como os espermatozoides se portam em seu meio natural porém pode ser dificultada por altas concentrações de espermatozoides e aglutinação de espermatozoides na lâmina, tornando difícil discernir padrões de motilidade individuais (VARNER et al., 2008).

A motilidade do sêmen é o indicador mais sensível do estresse oxidativo no sêmen equino. De fato, as espécies reativas de oxigênio causam redução da produção de ATP e danos ao axonema (BAUMBER et al., 2000). A motilidade também é suscetível a condições ambientais como por exemplo, calor excessivo ou frio, lubrificantes, luz, desinfetantes e osmolaridade/pH do diluente, por isso é necessário proteger o sêmen de agentes ou condições prejudiciais antes da análise. Para melhorar a confiabilidade da estimativa de motilidade, o procedimento deve ser realizado por uma pessoa experiente usando um microscópio devidamente equipado. As

estimativas das porcentagens de espermatozoides móveis e com movimento progressivo são geralmente avaliadas, além de uma estimativa do vigor (escala arbitrária de 0-5, estacionária a rápida, respectivamente) (LOVE, 2016). A incorporação de testes aprofundados, para a avaliação do sêmen não substitui nem diminui o valor das medidas clássicas da motilidade ou morfologia espermática; portanto, esses dois métodos provavelmente continuarão a ser preconizados para a avaliação de sêmen.

2.3.3 Avaliação computadorizada da motilidade espermática

Várias técnicas e instrumentos diferentes foram desenvolvidos para a avaliação objetiva (ou seja, imparcial) da motilidade espermática. Sistemas informatizados estão sendo utilizados rotineiramente em muitos laboratórios de referência, com a intenção de avaliar objetivamente as características de movimento dos espermatozoides. Apesar da disponibilidade comercial de várias gerações de sistemas de análise de espermatozoides assistidos por computador (CASA) por mais de 20 anos, sua presença não forneceu o teste definitivo para medir o potencial de fertilização do espermatozoide. A análise de espermatozoides assistida por computador também é baseada em características de motilidade. O sistema consiste de uma câmera, computador e software para gravar e analisar a motilidade do espermatozoide, o método é considerado caro e requer equipamentos específicos (VARNER et al., 2008; LOVE, 2016).

O sistema de análise, no entanto, pode não ser realista, dado os numerosos atributos espermáticos independentes necessários para que um espermatozoide possua competência de fertilização. As correlações entre os dados do CASA e a fertilidade não foram melhores do que aquelas baseadas em medidas visuais ou subjetivas da motilidade (O'CONNOR et al., 1981). Os parâmetros gerados da motilidade espermática dependendo do sistema podem ser: Total, é a soma de todas as células contadas móveis e não móveis; Motilidade Total, é a proporção de células móveis do total (%); Motilidade Progressiva, é a porcentagem de células móveis progressivamente (%); Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média ininterrupta do trajeto do espermatozoide; Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; Velocidade Curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, μm), é a largura média da oscilação da cabeça conforme

o espermatozoide se move; Frequência de Batimentos (BCF, Hz), é a frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se para trás e para frente; Retilinearidade (STR, %), é o valor médio entre VSL/VAP; Linearidade (LIN, %), é o valor médio entre VSL/VCL (AMANN e WABERSKI, 2014).

2.3.4 Avaliação da membrana plasmática

Existem diferentes testes disponíveis para avaliar a membrana espermática, as avaliações clássicas como a coloração supravital (eosina-negrosina) e o teste hiposmótico e mais recentes, os corantes fluorescentes como o iodeto de propídio (IP), que se liga e cora o DNA quando a membrana do espermatozoide está danificada. O IP pode ser utilizado combinado com o CFDA que penetra a membrana plasmática intacta e resulta em um composto fluorescente verde, enquanto que o IP se liga ao DNA e emite fluorescência vermelha em células com a membrana lesada (HARRISON e VICKERS, 1990). O teste hiposmótico (HOST) foi utilizado para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide (JEYENDRAN et al., 1984) e quando utilizado no sêmen equino, mostrou relação com a fertilidade (NEILD et al., 2000; NEILD et al., 2005). O HOST foi também utilizado para avaliar a integridade funcional da membrana espermática de cabritos (FONSECA et al., 2005), cães (QUINTELA et al., 2017) e touros (BÜYÜKLEBLEBICI et al., 2014). Em uma solução hiposmolar, o fluido é transferido para dentro da célula através da membrana plasmática dos espermatozoides. Na tentativa de alcançar equilíbrio entre meio intracelular e extracelular, quando a membrana está funcionalmente intacta, a célula começa a dilatar-se a partir da cauda. Esta dilatação ou edema da membrana leva a ondulação e invaginação. As mudanças nas fibras da cauda são claramente visíveis sob microscópio de contraste de fase. Esses espermatozoides são reconhecidos como reativos, significando que possuem membranas funcionalmente intactas. Os espermatozoides com a membrana funcionalmente defeituosa não incham e as caudas não invaginam (RASHEDI et al., 2016).

O teste HOST é, portanto melhor do que a coloração supravital para indicar o potencial de fertilização. Na coloração supravital, a membrana lesada do espermatozoide permite a penetração do corante e a célula irá corar em vermelho. Isso significa que todos os espermatozoides mortos na amostra serão corados, enquanto os espermatozoides vivos

permanecerão incolores. A coloração determina se a membrana do espermatozoide está ou não fisicamente danificada. O HOST determina se a membrana do espermatozoide intacta está ou não bioquimicamente ativa (ZANEVELD et al., 1990).

2.3.5 Atividade mitocondrial

Avaliar o status metabólico do espermatozoide é de grande importância quando se quer identificar a capacidade fertilizante. O ensaio de redução de MTT depende da capacidade das células metabolicamente ativas para reduzir o sal de tetrazólio (brometo de 3[4,5-dimethylthiazol-2-y1]-2,5-diphenyltetrazolium) a formazan. É um teste simples e com menor custo para determinar a viabilidade espermática. O método já foi utilizado em vários estudos e em diferentes tipos de células. O sal tetrazólio amarelo é convertido pelas células viáveis a formazan roxo insolúvel pelas mitocôndrias ativas do espermatozoide. A quantidade de formazan formada pode ser determinada espectrofotometricamente com absorvância de 570 nm e serve como uma estimativa da quantidade de mitocôndrias ativas, logo, o número de células vivas na amostra. Aziz et al. (2005) concluíram ao comparar o MTT ao citômetro de fluxo que o teste é valioso e que pode ser usado rotineiramente, principalmente quando tempo, custo e praticidade são necessários. O teste é rápido e, por ser realizado em placa de 96 poços, muitas amostras podem ser avaliadas ao mesmo tempo e muitas réplicas de cada amostra podem ser testadas simultaneamente.

2.3.6 Morfologia espermática

A morfologia dos espermatozoides é tipicamente examinada em microscopia de luz com aumento de 1000x e inclui a visualização do formato fisiológico e formas anômalas de espermatozoides. A visualização dos espermatozoides pode ser realizada através da fixação das células em solução formalina tamponada na técnica chamada de câmara úmida sob microscopia de contraste de fase ou através de esfregaços corados. Pelo menos 100 espermatozoides devem ser avaliados e o tipo e incidência de cada defeito devem ser registrados (BRITO, 2007).

As anormalidades ou alterações na morfologia espermática tradicionalmente foram classificadas como primárias, secundárias ou terciárias. As alterações primárias são consideradas

associadas a defeito na espermatogênese e, portanto, de origem testicular. Alterações secundárias são aquelas relacionadas ao epidídimo. As alterações terciárias, em oposição aos dois tipos anteriores, se desenvolvem *in vitro* como resultado de procedimentos inadequados de coleta ou manuseio de sêmen (VARNER et al., 2008).

Atualmente alguns autores preferem registrar o número de defeitos morfológicos específicos para cada região do espermatozoide. Este método de classificação é considerado superior ao sistema tradicional porque revela informações mais particulares sobre uma população de espermatozoides, evitando suposições sobre a origem desses defeitos. A origem de alguns defeitos morfológicos é desconhecida. Além disso, algumas alterações morfológicas como cabeças destacadas podem ser primárias, secundárias ou terciária, apresentando a possibilidade de erro ao utilizar a classificação tradicional exclusivamente (CARD, 2005; VEERAMACHANENI et al., 2006).

3 ARTIGO 1

TAMPÕES PARA DILUENTE DE RESFRIAMENTO DE SÊMEN DE PÔNEIS

Resumo

A composição, pH e a osmolaridade do diluente pode influenciar a qualidade do sêmen durante o resfriamento e este pode ser necessário pela distância logística entre o garanhão e as éguas a inseminar. Este estudo teve como objetivo identificar um tampão de pH para resfriamento de sêmen de pôneis por 48 horas a 5°C e 15°C. O efeito de cinco tampões (TES (ácido N-tris(hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico), PIPES (ácido piperaxín-N,N'-bis(2-etanosulfônico)), BES (ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico), MES (ácido 4-morfolinoetanosulfônico) e HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico)) foi avaliado quanto à viabilidade espermática, pH e osmolaridade em um diluente composto de leite em pó desnatado e glicose no sêmen fresco e resfriado a 5°C e 15°C por 48 horas. Em posse da concentração dos tampões com osmolaridade entre 320 e 350 mOsm e pH entre 7,0 e 8,0, os testes do diluente foram conduzidos com o sêmen fresco e resfriado. Os tampões BES, MES e TES foram selecionados dentro destas características e os outros descartados. O sêmen sem gel e após centrifugação foi diluído em três diferentes diluentes BES, MES, TES, e as amostras de 5 pôneis foram armazenadas em um dispositivo de resfriamento com temperatura a 5°C por 48 horas. As análises foram efetuadas no período de tempo 0, 24 e 48 horas após o resfriamento. Concluída esta etapa, os testes do diluente com os tampões BES, MES e TES foram conduzidos com o sêmen fresco de oito pôneis e no sêmen resfriado por 48 h a 15°C. Na sequência, uma amostra de cada grupo foi utilizada para análise da motilidade, pH, osmolaridade, teste hiposmótico, atividade mitocondrial (MTT) e integridade de membrana através das sondas fluorescentes. O pH e a osmolaridade dos diluentes sem o sêmen também foram avaliados. Os dados foram analisados por análise de variância e pelo teste de Tukey, quando $P < 0.05$ foi considerado como diferença significativa. A osmolaridade do sêmen diluído não variou entre diluentes e foi para o BES 350.91 ± 11.24 mOsm, MES 350.41 ± 11.76 mOsm e TES 350 ± 12.96 mOsm. O pH do sêmen após diluição nos respectivos diluentes diferiu entre as horas

avaliadas ($P < 0.05$) e não variou com o passar do tempo o que evidencia o efeito tamponante dos diluentes. A osmolaridade dos diluentes foi similar entre os tampões BES (366 ± 5.47 mOsm), MES (370 ± 6.12 mOsm) ou TES (371 ± 5.47 mOsm) a fresco e sem adição de sêmen. Já o pH variou ($P < 0.05$) de acordo com o tampão. No experimento a 5°C ocorreu decréscimo na porcentagem de motilidade total, progressiva e local do sêmen resfriado após 24 h e 48 h comparado a avaliação a fresco em todos os grupos. No entanto não houve diferença na porcentagem de espermatozoides móveis a fresco, 24 h e 48 h a 5°C entre tratamentos. A porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico, e com atividade mitocondrial não diferiu entre tratamentos. No experimento a 15°C o vigor e motilidade total, progressiva e local foram similares entre os tampões BES, MES e TES em cada período avaliado. A osmolaridade do sêmen diluído não variou entre diluentes e foi para o BES 360.93 ± 10.52 mOsm, MES 361.47 ± 6.79 mOsm e TES 361.56 ± 7.68 mOsm. Devido as características individuais de cada tampão o pH do sêmen diluído variou entre os diluentes com os tampões utilizados. A porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico, com atividade mitocondrial e membrana intacta observada com CFDA e PI não diferiu entre tratamentos. Evidenciou-se que tanto BES, MES ou TES podem ser utilizados no armazenamento e transporte do sêmen de pôneis durante 48 h a 5°C ou 15°C .

Palavras-chave: armazenamento, composição do diluente, qualidade do sêmen, equino

Abstract

Composition, pH and osmolarity influence the semen quality during cooling. The aim of this study was to identify a buffer for cooling semen of ponies for 48 h at 5°C and 15°C . The effect of five buffers (TES (N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethanesulfonic acid), PIPES (piperaxin-N, N'-bis (2-ethanesulfonic acid)), BES (N, N- (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)) was evaluated for sperm viability, pH and osmolarity in a extender composed of skim milk powder and glucose in fresh and cooled semen at 5°C and 15°C for 48 h. After identifying a concentration of the buffers with osmolarity between 320 and 350 mOsm and pH between 7.0 and 8.0, the tests were conducted with fresh and cooled semen. BES, MES and TES buffers were selected within these characteristics and the others discarded. Semen without

gel and after centrifugation was diluted in BES, MES, TES extenders. Samples from 5 ponies were stored in a cooling device with temperature at 5°C for 48 h. Analyzes were carried out in the time period 0, 24 and 48 hours after cooling. After this phase, the tests were conducted with semen of eight ponies for 48 h at 15°C. Subsequently, one sample from each group was used for analysis of motility, pH, osmolarity, hyposmotic test, mitochondrial activity (MTT) and membrane integrity through fluorescent probes. The pH and osmolarity of the extenders without semen were also evaluated. Data were analyzed by analysis of variance and Tukey's test, when $P < 0.05$ difference was significant. Osmolarity of the diluted semen did not vary between diluents and was for BES 350.91 ± 11.24 mOsm, MES 350.41 ± 11.76 mOsm and TES 350 ± 12.96 mOsm. The pH of the semen after dilution in the respective diluents varied between the hours evaluated ($P < 0.05$) and did not change over time as evidenced by the buffering effect of the extenders. Osmolarity of the diluents was similar between BES (366 ± 5.47 mOsm), MES (370 ± 6.12 mOsm) or TES (371 ± 5.47 mOsm) buffers after dilution and without addition of semen. The pH varied ($P < 0.05$) according to the buffer. In the 5°C experiment, there was a decrease in the percentage of total, progressive and local motility of the cooled semen after 24 h and 48 h compared to the fresh evaluation was observed in all groups. However, there was no difference in the percentage of motile sperm to fresh, 24 h and 48 h at 5°C between treatments. Percentage of spermatozoa reactive to hyposmotic test, and with mitochondrial activity did not differ between treatments. In the experiment at 15°C total, progressive and local vigor and motility were similar between the BES, MES and TES buffers in each evaluated period. Osmolarity of the diluted semen did not vary between extenders and was for BES 360.93 ± 10.52 mOsm, MES 361.47 ± 6.79 mOsm and TES 361.56 ± 7.68 mOsm. Due to the individual characteristics of each buffer the pH of diluted semen varied between the diluents with the buffers used. Percentage of spermatozoa reactive to the hyposmotic test, with mitochondrial activity and intact membrane observed with CFDA and PI did not differ between treatments. We concluded that either BES, MES or TES can be used in the storage and transport of semen of ponies for 48 h at 5°C or 15°C.

Keywords: cooled storage, semen quality, extender composition, equine

Introdução

Na espécie equina, a seleção animal não é realizada em função da performance reprodutiva. Com isso, a qualidade do sêmen contribui para o sucesso dos programas de reprodução. A inseminação artificial de éguas com sêmen resfriado tornou-se um procedimento de rotina na indústria de criação devido às boas taxas de fertilidade e custo relativamente baixo (CONTRI et al., 2010). O sêmen resfriado pode ser mantido armazenado por aproximadamente 24 h sem perdas significativas na sua capacidade fertilizante comparado ao sêmen fresco (MAGISTRINI et al., 1996) e as taxas de prenhez diminuem após 48 h de armazenamento (AURICH, 2008). Esse decréscimo na fertilidade foi atribuído as mudanças na membrana espermática (AURICH, 2005) e também a peroxidação lipídica, fosforilação oxidativa, fragmentação da cromatina e metilação de citosina do DNA que contribuem para causar lesões ao espermatozoide durante o resfriamento e transporte (KRAKOWSKI et al., 2013; GIBB et al., 2014; DE OLIVEIRA et al., 2017).

O uso de sêmen refrigerado ou congelado oferece inúmeras vantagens para os criadores e, nos últimos anos, grande parte das associações de raças equinas já permitem seu uso. Vários estudos estão sendo realizados no intuito de otimizar a fertilidade do sêmen pelo maior tempo possível para facilitar a coleta do sêmen, seu transporte e preservar a integridade e funcionalidade dos espermatozoides até o momento mais oportuno para a inseminação artificial (HECKENBICHLER et al., 2011).

Imediatamente após a coleta o sêmen deve ser diluído em meio adequado. Os diluentes possibilitam o controle do pH e osmolaridade do meio, fornecem energia para o espermatozoide e diluem o plasma seminal (MARTINS et al., 2016). Geralmente o sêmen diluído é resfriado e mantido a temperaturas próximas a 5°C ou 15°C com o objetivo de diminuir o metabolismo e com isso reduzir a depleção de ATP e a produção de espécies reativas de oxigênio (GIBB e AITKEN, 2016).

Estudos que examinaram o efeito de diferentes tampões de pH usados no resfriamento ou nos meios de criopreservação demonstraram que alguns tampões são melhores do que outros na manutenção da motilidade pós-descongelamento e integridade da membrana (CRABO et al., 1972; BROWN et al., 1972; GRAHAM et al., 1972; GARCIA e GRAHAM, 1989; MOLINIA et al., 1994).

Comumente, o bicarbonato de sódio foi o tampão preconizado para elaborar diluentes e meios de cultura. Na tentativa de melhorar os tampões de pH para uso em meios biológicos, Good e colaboradores desenvolveram uma série de novos tampões (FERGUSON et al., 1980; EAGLE, 1971; GOOD e IZAWA, 1972; GOOD et al., 1966). Estes compostos eram grande parte aminas alifáticas zwitteriônicas, ou aminoácidos alterados. *Zwitterions* tem a capacidade de atuar como ácido ou base, e são excelentes tampões de pH (WILL et al., 2011). No sêmen de pôneis da raça Brasileira, o tampão HEPES ou mesmo o diluente composto de leite em pó desnatado e glicose sem tampão demonstrou ser melhor para o resfriamento a 5°C do que o Bicarbonato de Sódio (TRENTIN et al., 2018).

A necessidade de produzir novos diluentes, ou modificações nos diluentes existentes no mercado nacional para promover melhores resultados é constante. Apesar do grande avanço na tecnologia do sêmen e a permissão de uso da inseminação artificial pela maioria das associações de raças, o procedimento ainda requer melhorias para alcançar padronização (HECKENBICHLER et al., 2011; GALLARDO BOLAÑOS et al., 2012). No presente trabalho foram avaliados tampões zwitteriônicos em diluentes para resfriamento para sêmen de pôneis com a finalidade de aumentar a eficiência em manter a viabilidade, o pH e a osmolaridade. Para isso avaliou-se o efeito de cinco diferentes tampões (TES (ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico), PIPES (ácido piperaxín-N,N'-bis(2-etanosulfônico)), BES (ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico), MES (ácido 4-morfolinoetanosulfônico) e HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico)) sobre a viabilidade espermática, pH e osmolaridade de um diluente composto por leite em pó desnatado e glicose imediatamente após a exposição do sêmen fresco e refrigerado a 5°C e 15°C, por 48 horas.

Material e Métodos

Pré-experimento

Os tampões utilizados na pesquisa foram o TES (ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico), PIPES (ácido piperaxín-N,N'-bis(2-etanosulfônico)), BES (ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico), MES (ácido 4-morfolinoetanosulfônico) e HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico) obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,

USA). Para determinar a concentração do tampão que resultaria em osmolaridade e pH ideal foram testadas diferentes concentrações dos tampões em diluente com leite em pó desnatado e glicose, sem adição do sêmen. Em posse da concentração dos tampões com osmolaridade entre 320 e 350 mOsm e pH entre 7,0 e 8,0, os testes do diluente foram conduzidos com o sêmen fresco e resfriado. Os tampões BES, MES e TES foram selecionados dentro destas características e os demais descartados.

Experimento 5°C

Os testes do diluente com os tampões BES, MES e TES foram conduzidos com o sêmen fresco de pôneis e no sêmen resfriado por 48 h a 5°C.

Experimento 15°C

Os testes do diluente com os tampões BES, MES e TES foram conduzidos com o sêmen fresco de pôneis e no sêmen resfriado por 48 h a 15°C.

Animais

Pôneis saudáveis com 10 anos de idade em média e pertencentes ao Laboratório de Embriologia Animal – Embryolab da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria/RS, Brasil (29°41’-03° Sul, 53°48’-25° Oeste) serviram para o estudo. Os animais, alocados em um potreiro com sombreamento receberam pastagem cultivada de aveia e azevém e água canalizada *ad libitum*, na área do Hospital Veterinário Universitário da UFSM. As coletas foram conduzidas durante a estação reprodutiva do hemisfério sul de novembro a janeiro de 2016 com anuência do comitê de ética da Universidade Federal de Santa Maria (N° 1318280916). Todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições de manejo e alimentação.

Coleta de sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial modelo Hannover com uma camisa sanitária plástica de polietileno descartável sobre o tubo flexível para a coleta de cada pônei. Os procedimentos de coleta seguiram o protocolo descrito por Klug e Sieme (2003). Os machos foram coletados duas vezes por semana. As coletas foram procedidas em uma pônei-manequim, devidamente contida.

Análise do sêmen

Após a coleta, o sêmen foi filtrado com gaze estéril e a fração gel desprezada. As análises macroscópicas do ejaculado como volume, cor e aspecto foram conduzidas imediatamente após a coleta. Uma amostra do sêmen fresco foi separada para avaliação do pH, osmolaridade e concentração. O volume total do ejaculado foi dividido em três frações e diluído a proporção 1:1 (sêmen:diluyente) com três diferentes diluentes (BES, MES, TES) e centrifugado a 600 x g por 10 minutos para remoção do plasma seminal. Removido o sobrenadante, o pellet foi ressuspendido no respectivo diluyente e a concentração foi ajustada para 50×10^6 spz/mL. A composição dos diluentes foi a seguinte: TES: 2,4 g de leite em pó desnatado, 4,9 g de glicose, 0,1 g de TES (ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico); MES: 2,4 g de leite em pó desnatado + 4,9 g de glicose + 0,1 g de MES (ácido 4-morfolinoetanosulfônico); BES: 2,4 g de leite em pó desnatado + 4,9 g de glicose + 0,1 g de BES (ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico). A quantidade pesada para cada tampão foi definida devido a facilidade de pesagem e ínfima variação no pH entre diferentes concentrações dos tampões no pré-experimento.

Na sequência, uma amostra de cada grupo foi utilizada para análise da motilidade (total, progressiva e local), pH, osmolaridade, teste hiposmótico, atividade mitocondrial (MTT) e integridade de membrana através das sondas fluorescentes. Uma amostra de cada diluyente foi destinada para avaliação do pH e osmolaridade. O pH foi aferido no sêmen fresco diluído e nas 24 h e 48 h de resfriamento (pH Meter Tec-2, Tecnal). O restante da amostra foi mantida resfriada em Botu-Flex (Botupharma, Brazil), recipiente específico para resfriamento a 5°C ou 15°C, conforme as instruções do fabricante. Novas avaliações foram efetuadas em 24 h e 48 h de

resfriamento. As avaliações das amostras resfriadas por 24 e 48 h a 5°C ou 15°C foram conduzidas após 5 minutos de aquecimento em mesa térmica ajustada a 37°C.

Motilidade espermática

A avaliação da motilidade espermática foi efetuada de acordo com Varner et al. (1989) através da determinação percentual de espermatozoides móveis no ejaculado e a caracterização do tipo de movimento a fresco, 24 h e 48 h de resfriamento. As amostras foram avaliadas sob microscópio de contraste de fase (200x e 400x) quanto ao movimento progressivo (MP), movimento local (ML) e imóveis (I), com 15 µL de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C, de forma subjetiva, pelo mesmo observador.

Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada através de câmara de Neubauer retirando-se do ejaculado uma amostra de 50 µL para adicioná-la um tubo contendo 9,95 mL de formol-salina. Após homogeneização montou-se a câmara de Neubauer preenchendo seus dois retículos. Todos os espermatozoides presentes em 5 quadrados de cada retículo da câmara foram contados. Para a obtenção do número de espermatozoides por mL o cálculo foi realizado de acordo com altura, área da câmara e número de espermatozoides contados.

Teste de funcionalidade de membrana (HOST)

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pelo teste hiposmótico. As amostras foram incubadas a 37°C por oito minutos, de acordo com o protocolo de Lomeo e Giambérsio (1991) e adaptado para equinos por Lagares et al. (2000). Posteriormente, a análise foi conduzida sob microscópio de contraste de fase (400x), sob lâmina e lamínula contando 100 espermatozoides por amostra. Os espermatozoides íntegros foram considerados como aqueles que apresentaram edema de cauda.

Atividade mitocondrial através da redução do Tetrazolium (MTT)

O ensaio de redução de MTT depende da capacidade das células metabolicamente ativas em reduzir o sal tetrazólico (3 [4,5-dimetiltiazol-2-y1] -2,5-difeniltetrazólio) a formazan (AZIZ et al., 2005). O método foi realizado conforme protocolo adaptado de Mosmann, (1983) e Aziz et al. (2005). Para a determinação da atividade mitocondrial, uma alíquota de cada amostra de sêmen foi centrifugada a 600 x g por 10 minutos para obtenção de concentração de 100×10^6 sptz/mL. O pellet foi ressuspendido com o diluente conforme a amostra e o sobrenadante foi descartado; e 200 μ L da amostra com 100×10^6 sptz/mL foi depositada em tubos de microcentrífuga de 2 mL. Após, 20 μ L da solução de Tetrazolium (5mg/mL de Thiazolyl Blue Tetrazolium (Sigma-Aldrich) em PBS salino) foi adicionado ao tubo e incubado por 30 minutos em banho-maria a 37°C. Após o tempo de incubação, 200 μ L de solução de 0,04 N de HCl em Isopropanol foram adicionados a amostra. Em seguida, cada tubo foi centrifugado a 1200 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para mensurar a atividade metabólica mitocondrial em espectrofotometria de luz visível com 540 nm de comprimento de onda, considerando o branco a solução composta por diluente, solução de MTT e 0,04 N HCl-isopropanol. As alíquotas diluídas de cada garanhão e os brancos dos diluentes foram analisadas em triplicatas.

Integridade de membrana plasmática do espermatozoide através de microscopia de fluorescência

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática foram utilizadas as sondas fluorescentes iodeto de propídeo (IP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A técnica adaptada da descrita por Harrison e Vickers (1990), contendo solução de CFDA, solução de IP, solução de formaldeído e solução de citrato de sódio foi utilizada. Após 8 minutos de incubação a 37°C, uma gota da amostra foi colocada entre lâmina e lamínula e 200 células foram analisada sob microscópio de epifluorescência (1000x). Os espermatozoides corados em vermelho foram considerados com membrana não intacta (não viáveis) e os corados totalmente em verde foram considerados intactos e viáveis.

Análise estatística

O software SAS® (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC) foi utilizado para a análise estatística. Os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foi efetuada através do Teste de Tukey.

Resultados

Experimento 5°C

Os pôneis (n=5) foram submetidos a coletas de sêmen (3 ejaculados por pônei) e o sêmen foi mantido resfriado a 5°C por 48 h. Os valores médios e desvio-padrão do volume (livre de gel), concentração, pH e osmolaridade dos ejaculados obtidos dos cinco garanhões utilizados neste experimento foram, respectivamente, de $21,53 \pm 11,28$ mL, $272,33 \pm 187,89 \times 10^6$ sptz/mL, $7,58 \pm 0,18$ e $287,08 \pm 5,57$ mOsm.

Os resultados das avaliações realizadas estão expressos na Tabela 1. Um decréscimo na porcentagem de motilidade total, progressiva e local do sêmen resfriado após 24 h e 48 h comparado a avaliação a fresco foi observado em todos os grupos. No entanto não houve diferença na porcentagem de espermatozoides móveis a fresco, 24 h e 48 h a 5°C entre tratamentos. A porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico, e com atividade mitocondrial não diferiu entre tratamentos (Tabela 2).

Tabela 1 - Vigor, motilidade total, progressiva e local de sêmen resfriado por 48 h a 5°C de pôneis da raça Brasileira em diluente com ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).

Parâmetro avaliado	Diluente	Tempo de resfriamento		
		0 h	24 h	48 h
Vigor	BES	3,8 ± 0,4	3,13 ± 0,63	2,53 ± 0,51
	MES	3,8 ± 0,4	3,26 ± 0,45	2,53 ± 0,51
	TES	3,8 ± 0,41	3,26 ± 0,45	2,66 ± 0,48
Motilidade Total (%)	BES	72,66 ± 6,51	55,33 ± 12,45	42,33 ± 13,21
	MES	73,33 ± 6,17	57,33 ± 10,83	44,33 ± 10,83
	TES	75,33 ± 4,80	54,66 ± 8,12	43,66 ± 11,41
Motilidade Progressiva (%)	BES	64,66 ± 8,33	44,33 ± 13,47	28,33 ± 13,04
	MES	65,66 ± 7,98	46,00 ± 10,38	28,66 ± 11,72
	TES	67,33 ± 6,77	44,33 ± 8,83	27,66 ± 12,65
Motilidade Local (%)	BES	8,33 ± 2,43	12,66 ± 4,95	19,66 ± 8,54
	MES	8,00 ± 2,53	12,66 ± 4,57	19,66 ± 7,43
	TES	8,33 ± 2,43	12,33 ± 5,93	19,66 ± 7,43

ANOVA, Teste de Tukey, P > 0.05.

Tabela 2 - Teste hiposmótico e atividade mitocondrial de sêmen resfriado por 48 h a 5°C de pôneis da raça Brasileira em diluente com ácido N,N-Bis(2-18hidroxietyl)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).

Parâmetro seminal		Tempo de resfriamento		
		Diluente	0 h	24 h
Funcionalidade da membrana (HOST, %)	BES	63,4 ± 13,86 ^a	41,00 ± 12,98 ^b	40,85 ± 11,97 ^b
	MES	63,93 ± 12,65 ^a	36,857 ± 12,77 ^b	38,93 ± 11,37 ^b
	TES	59,00 ± 11,084 ^a	41,467 ± 14,04 ^b	38,20 ± 13,32 ^b
Atividade mitocondrial (MTT)	BES	503,40 ± 75,1 ^a	491,50 ± 71,86 ^a	375,71 ± 88,66 ^b
	MES	466,36 ± 65,86 ^a	476,71 ± 86,88 ^a	411,93 ± 139,68 ^a
	TES	480,83 ± 71,49 ^a	482,61 ± 135,75 ^a	408,93 ± 132,27 ^a

^{a, b} Letras diferentes nas linhas indicam diferença (P < 0.05).

A osmolaridade do sêmen diluído não variou entre diluentes e foi para o BES 350.91 ± 11.24 mOsm, MES 350.41 ± 11.76 mOsm e TES 350.00 ± 12.968 mOsm. O pH do sêmen após diluição nos respectivos diluentes variou entre as horas avaliadas (P < 0.05) e não variou com o passar do tempo o que evidencia o efeito tamponante dos diluentes (Tabela 3).

Tabela 3 – Determinação do pH de sêmen diluído e resfriado por 48 h a 5°C de pôneis da raça Brasileira acrescido de ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).

Tampão em diluyente	Tempo de resfriamento		
	0 h	24 h	48 h
BES	6,90 ± 0,18 ^{Ba}	7,00 ± 0,22 ^{ABa}	6,91 ± 0,11 ^{ABa}
MES	6,78 ± 0,20 ^{Ba}	6,88 ± 0,25 ^{Ba}	6,86 ± 0,19 ^{Ba}
TES	7,05 ± 0,16 ^{Aa}	7,09 ± 0,28 ^{Aa}	7,03 ± 0,17 ^{Aa}

^{a, b} Letras maiúsculas diferentes nas colunas e minúsculas nas linhas indicam diferença ($P < 0.05$).

A osmolaridade dos diluentes foi similar entre os tampões BES (366.00 ± 5.47 mOsm), MES (370 ± 6.12 mOsm) ou TES (371 ± 5.47 mOsm) a fresco e sem adição de sêmen. Já o pH variou ($P < 0.05$) de acordo com o tampão (Tabela 4).

Tabela 4 – Determinação do pH dos diluentes com ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES) por 48 h de resfriamento a 5°C.

Tampão em diluyente	Tempo de resfriamento		
	0 h	24 h	48 h
BES	6,62±0,10 ^b	6,74±0,20 ^a	6,86±0,04 ^a
MES	6,64±0,15 ^b	6,72±0,24 ^a	6,67±0,06 ^b
TES	6,98±0,15 ^a	6,92±0,15 ^a	6,94±0,07 ^a

^{a, b} Letras diferentes indicam diferença ($P < 0.05$) nas colunas.

Experimento 15°C

Pôneis saudáveis da raça Brasileira, com 10 anos de idade em média (n=8) foram submetidos a coletas de sêmen (3 ejaculados/pônei). Cada ejaculado foi submetido após centrifugação a um diluente e foi mantido resfriado por 48 h a 15°C com os tampões BES, MES e TES. Os valores médios e desvio-padrão do volume (livre de gel), concentração, pH e osmolaridade dos ejaculados dos oito garanhões neste experimento foram, respectivamente, de $20,83 \pm 10,12$ mL, $276,87 \pm 143,06 \times 10^6$ spz/mL, $7,50 \pm 0,18$ e $275,25 \pm 6,56$ mOsm.

O vigor e motilidade total, progressiva e local foram similares entre os tampões BES, MES e TES em cada período avaliado (Tabela 5). A osmolaridade do sêmen diluído não variou entre diluentes e foi para o BES $360,93 \pm 10,52$ mOsm, MES $361,47 \pm 6,79$ mOsm e TES $361,56 \pm 7,68$ mOsm.

Devido as características individuais de cada tampão o pH do sêmen diluído variou entre os diluentes (Tabela 6). A porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico, com atividade mitocondrial e a membrana intacta observada com CFDA e PI foi similar entre tratamentos (Tabela 7).

Tabela 5 - Vigor, motilidade total, progressiva e local de sêmen resfriado a 15°C por 48 h de pôneis da raça Brasileira submetidos a diluente com tampão de ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris(hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).

Parâmetro		Tempo de resfriamento		
seminal	Diluente	0 h	24 h	48 h
Vigor	BES	3,70 ± 0,62	3,04 ± 0,62	2,75 ± 0,84
	MÊS	3,75 ± 0,60	3,12 ± 0,67	2,75 ± 0,84
	TES	3,62 ± 0,92	3,00 ± 0,93	2,58 ± 1,10
Motilidade Total (%)	BES	67,70 ± 15,74	54,79 ± 14,17	39,16 ± 16,26
	MÊS	67,70 ± 15,32	56,87 ± 13,57	39,16 ± 15,44
	TES	66,87 ± 16,66	52,29 ± 17,63	41,87 ± 18,69
Motilidade Progressiva (%)	BES	56,87 ± 16,92	42,08 ± 15,87	28,75 ± 14,76
	MÊS	57,08 ± 15,59	45,00 ± 13,83	28,12 ± 13,65
	TES	56,04 ± 16,74	41,04 ± 16,93	31,45 ± 16,31
Motilidade Local (%)	BES	10,41 ± 5,29	12,50 ± 6,07	10,41 ± 3,87
	MÊS	10,20 ± 3,75	11,45 ± 5,20	10,41 ± 4,87
	TES	10,83 ± 5,03	10,41 ± 5,29	10,20 ± 4,77

ANOVA, Teste de Tukey, P > 0.05

Tabela 6 – Determinação do pH do sêmen resfriado por 48 h a 15°C de pôneis da raça Brasileira em diluente com ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).

Tampão em diluente	Tempo de resfriamento		
	0 h	24 h	48 h
BES	6,79 ± 0,07 ^b	6,74 ± 0,19 ^b	6,35 ± 0,39 ^a
MÊS	6,56 ± 0,12 ^c	6,59 ± 0,11 ^c	6,27 ± 0,31 ^a
TES	6,90 ± 0,08 ^a	6,85 ± 0,15 ^a	6,32 ± 0,41 ^a

^{a, b, c} Letras diferentes indicam diferença (P < 0.05) nas colunas.

Tabela 7 - Teste hiposmótico, atividade mitocondrial e integridade de membrana de sêmen resfriado de pôneis da raça Brasileira por 48 h a 15°C em diluente com ácido N,N-Bis(2-18hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico (BES), ácido 4-morfolinoetanosulfônico (MES), ou ácido N-tris (hidroximetil) metil-2-aminoetanosulfônico (TES).

Parâmetro avaliado	Diluente	Tempo de resfriamento		
		0 h	24 h	48 h
Funcionalidade de membrana (HOST, %)	BES	60,37 ± 14,70	45,34 ± 16,68	34,91 ± 17,71
	MES	62,54 ± 12,81	38,91 ± 17,35	35,21 ± 18,80
	TES	59,95 ± 13,34	45,78 ± 17,16	40,60 ± 18,26
Atividade mitocondrial (MTT)	BES	344,93 ± 69,32	348,95 ± 45,22	434,41 ± 134,73
	MES	410,45 ± 193,62	351,26 ± 90,17	454,91 ± 239,11
	TES	402,68 ± 146,57	360,10 ± 65,53	492,79 ± 166,77
Integridade de membrana (CFDA/PI, %)	BES	81,23 ± 13,88	89,53 ± 6,43	95,65 ± 4,66
	MES	75,23 ± 16,02	84,47 ± 8,56	95,58 ± 3,80
	TES	83,26 ± 18,34	88,16 ± 10,83	98,38 ± 1,66

ANOVA, Teste de Tukey, P > 0.05

Discussão

A eficiência da técnica para resfriamento do sêmen equino ainda permanece limitada. As taxas gestacionais relatadas na literatura com sêmen resfriado indicam que estes índices oscilam entre 50 a 60% por ciclo (SQUIRES, 2009; HECKENBICHLER et al., 2011; PUGLIESI et al., 2012; KISER et al., 2014).

Na presente pesquisa, o período de avaliação de 48 h para o resfriamento foi escolhido para mimetizar o tempo necessário para enviar o sêmen até locais distantes. O declínio na motilidade foi observado durante os períodos de resfriamento corroborando os achados de Zhandi e Ghadimi (2014). Love et al. (2015) afirmam que a viabilidade espermática está relacionada com a fertilidade do sêmen resfriado. O sêmen da maioria dos garanhões sobrevive ao resfriamento a 4°C e mantém a fertilidade a níveis aceitáveis de 48 até 72 h se mantida a temperatura (KATILA, 2011; GRAHAM, 2011). Foster et al. (2011) ao compararem motilidade total avaliada pelo CASA e integridade de membrana pelo citômetro de fluxo de sêmen de garanhões descobriram que o dano às membranas espermáticas é significativamente maior após 48 horas de armazenamento refrigerado a 5°C.

A escolha do resfriamento a 5 ou 15° C foi pelo fato do sistema ser de baixo custo e facilmente acessível para a maioria dos veterinários de campo. Ainda, esta opção possibilita o resfriamento a taxas lentas de resfriamento evitando danos as membranas espermática e perda da viabilidade. A temperatura desempenha papel significativo no pH e no tampão de pH. Em geral, à medida que a temperatura aumenta, o pH e pKa diminuem (GOOD et al., 1966; WILL et al., 2011). Assim, alguns tampões que podem ser adequados para procedimentos a determinada temperatura podem não ser para outras. No entanto, no nosso experimento, os três tampões testados proporcionaram viabilidade espermática em ambas temperaturas por 48 h de resfriamento. Já quando o sistema de resfriamento a ser utilizado não garante a conservação da temperatura e as temperaturas estão elevadas é recomendado o resfriamento a 5°C, enquanto que temperaturas de transporte de 15°C a 20°C podem ser indicadas para curtos períodos de transporte e para garanhões que sejam sensíveis ao resfriamento (CUERVO-ARANGO et al., 2015).

Em nossa pesquisa, a temperatura de 15°C para o resfriamento foi escolhida visualizando que os espermatozoides mantivessem maior atividade metabólica e com isso maior

competência de secreção de produtos pelo metabolismo celular com capacidade de alterar o pH do meio. A taxa de prenhez aumentou significativamente quando o sêmen de garanhões foi resfriado por 24 horas a 15°C quando comparado a 4°C no mesmo período (BATELLIER et al., 1998). Em décadas anteriores estes benefícios em manter o sêmen entre 15 e 20°C foram descritos na literatura (PROVINCE et al., 1985; FRANCL et al., 1987; VARNER et al., 1989; BATELLIER et al., 1998) e inclusive em período mais recente (VIDAMENT et al., 2012), porém temperaturas acima de 10°C não reduzem suficientemente o metabolismo espermático, originando muitos produtos residuais que podem alterar as atividades enzimáticas, o pH do meio, gerar espécies reativas ao oxigênio, induzir a peroxidação lipídica que causam alterações de membrana celular e perda da viabilidade (GRAHAM, 2011).

Os diluentes fornecem nutrientes, minimizam o crescimento bacteriano e protegem os espermatozoides contra o choque térmico causado pelo frio, estabilizam os sistemas enzimáticos e a integridade de membrana (CRESPILHO et al., 2013) e neutralizam produtos tóxicos (PICKETT e AMANN, 1987), sem estes o resfriamento não seria possível. A adição de leite desnatado ao diluente de sêmen equino para resfriamento a 5°C por 12 h mostrou ter papel crucial na preservação espermática (BATELLIER et al., 1998; FLOREZ-RODRIGUEZ et al., 2014). Em diluentes à base de leite, fosfocaseinatos e b-lactoglobulina estão envolvidos na manutenção da motilidade espermática (BATELLIER et al., 1997; MANJUNATH, 2012). Alguns autores sugerem que a composição do diluente e a fonte de proteína exerce papel fundamental na sobrevivência do espermatozoide resfriado (BATELLIER et al., 1997; MANJUNATH, 2012). Florez-Rodriguez et al. (2014) ao caracterizar a morfofuncionalidade do espermatozoide equino expondo-os por 12h ao resfriamento com distintos diluentes evidenciaram diferenças na descondensação da cromatina demonstrando que a composição do diluente exerce influência na integridade da cromatina espermática.

A pesquisa de Heckenbichler et al. (2011) avaliou no momento da inseminação a qualidade e fertilidade do sêmen equino resfriado e transportado revelando maior quantidade de defeitos de acrossoma com uso de temperaturas maiores que 14°C durante o transporte do sêmen.

Crespilho et al. (2013) ao testarem o efeito da adição de colesterol, tampões e o pH do sêmen equino resfriado a 5°C concluíram que diminuir o pH do meio não beneficia a viabilidade pois ao incubar os espermatozoides em pH 6.6 não afetou nenhum dos parâmetros avaliados.

HEPES foi um melhor tampão quando comparado ao diluente Tris no pH fisiológico e qualidade espermática de carneiros (YÁNIZ et al., 2011).

Os pôneis utilizados nessa pesquisa foram mantidos sob o mesmo manejo e ambiente, sendo que os ejaculados foram coletados regularmente duas vezes por semana. A longevidade do sêmen armazenado refrigerado foi adequada e, portanto, estes podem ser classificados como "bons refrigeradores" (BRINSKO et al., 2000). A manutenção do sêmen durante o resfriamento por 48 h nos três tampões testados não alterou a viabilidade espermática que diminuiu conforme aumentou o tempo armazenado.

Conclusão

O sêmen de pôneis da raça Brasileira em diluente composto de leite em pó desnatado, glicose com tampão BES, MES ou TES pode ser utilizado tanto para o armazenamento quanto para o transporte a 5°C ou a 15°C durante 48 h.

Referências

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

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

AZIZ, D. M.; AHLWEDE, L.; ENBERGS, H. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1350-1356, 2005.

BATELLIER, F. et al. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, n. 3, p. 391-410, 1997.

BATELLIER, F. et al. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15 C under aerobic conditions. **Theriogenology**, v. 50, n. 2, p. 229-236, 1998.

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, n. 1, p. 129-136, 2000.

BROWN, K. I.; GRAHAM, E. F.; CRABO, B. G. Effect of some hydrogen ion buffers on storage and freezing of turkey spermatozoa. **Poultry Science**, v. 51, n. 3, p. 840-849, 1972.

CONTRI, A. et al. Efficiency of different extenders on cooled semen collected during long and short day length seasons in Martina Franca donkey. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 136-141, 2010.

CRABO, B. G.; BROWN, K. I.; GRAHAM, E. F. Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 35, n. 2, p. 377-382, 1972.

CRESPILHO, A. M. et al. The effect of cholesterol addition, buffer, and pH on equine sperm stored at 5° C. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 8, p. 663-666, 2013.

CUERVO-ARANGO, J. et al. The effect of storage temperature of stallion semen on pregnancy rates. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 7, p. 611-616, 2015.

DE OLIVEIRA, R. A. et al. Cooled-storage of equine semen does not induce major changes in sperm DNA methylation. **Theriogenology**, v. 89, p. 289-294, 2017.

EAGLE, H. Buffer combinations for mammalian cell culture. **Science**, v. 174, n. 4008, p. 500-503, 1971.

FERGUSON, W. J. et al. Hydrogen ion buffers for biological research. **Analytical Biochemistry**, v. 104, n. 2, p. 300-310, 1980.

FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A. et al. Morphofunctional characterization of cooled sperm with different extenders to use in equine-assisted reproduction. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 7, p. 911-917, 2014.

FOSTER, M. L. et al. Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1499-1505, 2011.

FRANCL, A. T. et al. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20° C. **Theriogenology**, v. 27, n. 3, p. 517-525, 1987.

GALLARDO BOLAÑOS, J. M. et al. Autophagy and apoptosis have a role in the survival or death of stallion spermatozoa during conservation in refrigeration. **PLoS one**, v. 7, n. 1, p. e30688, 2012.

GARCIA, M. A.; GRAHAM, E. F. Development of a buffer system for dialysis of bovine spermatozoa before freezing. I. Effect of zwitterion buffers. **Theriogenology**, v. 31, n. 5, p. 1021-1028, 1989.

GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; AITKEN, R. J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 3, p. 77, 1-10, 2014.

GIBB, Z.; AITKEN, R. J. The impact of sperm metabolism during in vitro storage: the stallion as a model. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

GOOD, N. E. et al. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 467-477, 1966.

GOOD, N. E.; IZAWA, S. [3] Hydrogen ion buffers. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, p. 53-68, 1972.

GRAHAM, E. F.; CRABO, B. G.; BROWN, K. I. Effect of Some Zwitter Ion Buffers on the Freezing and Storage of Spermatozoa I. Bull. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 3, p. 372-378, 1972.

GRAHAM J. K. Principles of cooled semen. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Wiley- Blackwell; v.2, p. 1308–1315, 2011.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

HECKENBICHLER, S. et al. Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 849-856, 2011.

KATILA, T. Containers for equine transported semen. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, editors. **Equine Reproduction**. 2nd ed. Wiley-Blackwell; p. 1330–6, 2011.

KISER, A. M. et al. Relationship of sperm quality to fertility after 4 days of cooled storage of equine semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 5, p. 602-605, 2014.

KLUG, E.; SIEME, H. **Samenübertragung beim Pferd in Theorie und Praxis**. Verlag M. & H. Alfeld, 5° völlig überarbeitete Auflage, Hannover, 2003.

KRAKOWSKI, L. et al. Assessment of extent of apoptosis and DNA defragmentation in chilled semen of stallions during the breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 5, p. 826-832, 2013.

LAGARES, M. A. et al. Assessing equine sperm-membrane integrity. **Andrologia**, v. 32, n. 3, p. 163-167, 2000.

LOMEO, A. M.; GIAMBERSIO, A. M. 'Water-test': a simple method to assess sperm-membrane integrity. **International Journal of Andrology**, v. 14, n. 4, p. 278-282, 1991.

LOVE, C. C. et al. The relationship between sperm quality in cool-shipped semen and embryo recovery rate in horses. **Theriogenology**, v. 84, n. 9, p. 1587-1593. e4, 2015.

MAGISTRINI, M. et al. Fertility prediction in stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 181-188, 1996.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 4, p. 809-15, 2012.

MARTINS, H. S. et al. Milk, caseinate and lactoferrin addition to equine semen cooling extenders. **Andrologia**, v. 48, n. 9, p. 950-956, 2016.

MOLINIA, F. C.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. **Reproduction Nutrition Development**, v. 34, n. 5, p. 491-500, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 5, p. 289-302, 1987.

PROVINCE, C. A. et al. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 23, n. 6, p. 925-934, 1985.

PUGLIESI, G. et al. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 12, p. 2411-2417, 2012.

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

TRENTIN, J. M. et al. Sodium bicarbonate and HEPES as buffer components for cooling the semen of pony stallions. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 2, p. 631-642, 2018.

VARNER, D. D. et al. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20° C. **Theriogenology**, v. 32, n. 4, p. 515-525, 1989.

VIDAMENT, M. et al. Temperatures from 4 to 15° C are suitable for preserving the fertilizing capacity of stallion semen stored for 22 h or more in INRA96 extender. **Theriogenology**, v. 78, n. 2, p. 297-307, 2012.

ZHANDI, M.; GHADIMI, V. Effect of glutathione-supplemented INRA82 extender on miniature Caspian stallion sperm quality during storage at 5 C. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 5, p. 606-610, 2014.

YÁNIZ, J. L.; MATEOS, J. A.; SANTOLARIA, P. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15° C. **Small Ruminant Research**, v. 95, n. 1, p. 54-60, 2011.

WILL, M. A.; CLARK, N. A.; SWAIN, J. E. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 8, p. 711-724, 2011.

4 ARTIGO 2

SUPLEMENTAÇÃO ORAL DE PONEIS COM DHA E EFEITO DA VITAMINA E: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO SÊMEN E ESTRESSE OXIDATIVO

Resumo

O teor de ácidos graxos das membranas dos espermatozoides pode influenciar a resistência a baixas temperaturas. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a influência da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados sobre a qualidade de sêmen de pôneis da raça Brasileira a fresco e após congelamento. Oito pôneis receberam sua dieta convencional não suplementada (grupo controle) ou dieta convencional e 70 g de farinha de alga *Schizochytrium sp* rica em DHA (grupo PUFA). O efeito da Vitamina E (1 mM, DL- α -tocoferol, T3376, Sigma-Aldrich), adicionada ao diluente de congelamento para sêmen de pôneis da raça Brasileira também foi avaliado sobre a qualidade seminal, antes e após o congelamento do sêmen. O sêmen foi coletado a cada 15 dias durante 60 dias. Os garanhões suplementados passaram para controle e vice-versa após um intervalo de sessenta dias. O sêmen foi avaliado a fresco e após o congelamento. Motilidade e vigor foram avaliados a fresco. Após o descongelamento motilidade, funcionalidade de membrana, integridade de membrana e análise computadorizada da motilidade foram avaliados. Os efeitos do tratamento, tempo, tipo de sêmen e suas interações foram submetidas a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os valores médios para os parâmetros avaliados a fresco no grupo PUFA e controle foram similares. Os valores médios da motilidade total, progressiva e local, hiposmótico, CFDA/PI e análise computadorizada de sêmen de pôneis da raça Brasileira suplementados com DHA e o grupo controle pós-descongelamento não diferiram. A associação da suplementação de DHA e Vitamina E adicionada ao diluente não potencializou a capacidade antioxidante do diluente durante o congelamento. A associação da suplementação de DHA e Vitamina E adicionada ao diluente resultou em diminuição da motilidade total e progressiva comparada ao grupo não suplementado (controle). A suplementação de 70 g de farinha de alga *Schizochytrium sp* rica em DHA e ou a inclusão de 1 mM de vitamina E ao diluente de congelamento de sêmen em pôneis da raça Brasileira não foi

eficiente para promover melhoria na viabilidade seminal após a coleta ou mesmo após o descongelamento.

Palavras-chave: antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados, qualidade do sêmen

Abstract

Fatty acid content of sperm membranes can influence resistance to low temperatures during cooling and freezing process. This study investigated the influence of polyunsaturated fatty acid supplementation on the fresh and thawed semen of Brazilian ponies. Eight ponies received their conventional diet (control group) or conventional diet and 70 g of DHA-rich *Schizochytrium sp* algae meal (PUFA group). The effect of Vitamin E (1 mM, DL- α -tocopherol, T3376, Sigma-Aldrich), added to the freezing diluent for semen was also evaluated on seminal quality before and after semen freezing. Semen was collected every 15 days for 60 days. The stallions were reversed in the treatments after an interval of sixty days. Semen was evaluated fresh and after freezing. Motility and vigor were evaluated in fresh semen. After thawing motility, membrane functionality, membrane integrity and computerized motility analysis were recorded. Effects of the treatment, time, type of semen and their interactions were submitted to analysis of variance and the means compared by the Tukey test. Mean values for fresh parameters evaluated in the PUFA and control groups were similar. Mean values of total, progressive and local motility, hyposmotic, CFDA/PI and computerized semen analysis of Brazilian ponies supplemented with DHA and the post-thaw control group did not differ. Combination of DHA and Vitamin E supplementation added to the extender did not potentiate the antioxidant capacity of the diluent during freezing and resulted in decreased total and progressive motility compared to the non-supplemented (control) group. Supplementation of 70 g of DHA-rich *Schizochytrium sp* and the addition of 1 mM vitamin E to the semen freezing diluent in Brazilian ponies was not efficient to promote improvement in seminal viability after collection or even after thawing.

Keywords: antioxidants, polyunsaturated fatty acids, semen quality

Introdução

Na espécie equina, a seleção dos garanhões é realizada com base na performance atlética, morfológica e no pedigree e não em função da capacidade reprodutiva, o que resulta em grande variação da fertilidade entre garanhões (GIBB e AITKEN, 2016). O sêmen equino resfriado e diluído fica viável por apenas 48 h limitando sua utilização, enquanto o sêmen congelado pode estar disponível na fazenda para uso a qualquer momento e é o único método para armazenamento de sêmen por um período indefinido de tempo.

O sêmen dos animais domésticos possui altos níveis de ácido graxos poli-insaturados (PUFAs) em particular, ácido docosahexaenóico (DHA, ômega 3) e ácido docosapentaenóico (DPA, ômega 6). O sêmen equino contém alto nível de DPA (PARKS e LYNCH, 1992). Estudos em caprinos demonstraram que elevada taxa de DHA:DPA no sêmen resulta em melhoria da fertilidade, enquanto que altos níveis de DPA relativo ao DHA reduz a fertilidade (PENNY et al., 2000; MALDJIAN et al., 2003). Os animais não conseguem sintetizar PUFAs, a partir de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados; então, devem adquiri-los de precursores em sua dieta. Infelizmente, a maioria dos alimentos fornecidos para cavalos possuem altos níveis de precursores de ácidos graxos ômega-6, enquanto os precursores de ácidos graxos ômega-3, como DHA, são muito baixos (GARMSIR et al., 2014).

Nos cavalos, a proporção fisiológica do colesterol em relação aos fosfolipídios na membrana plasmática do espermatozoide pode prejudicar a sua capacidade de passar pelo processo de resfriamento e especialmente ao congelamento com êxito (LOOMIS e GRAHAM, 2008). Isto se deve ao fato que a proporção de colesterol para fosfolipídios não pode ser alterada no espermatozoide (SCHMID-LAUSIGK e AURICH, 2014), pois é determinada geneticamente para cada espécie e cada indivíduo. Na década passada, os estudos se concentraram no efeito da adição de ácidos graxos poli-insaturados à dieta para aumentar sua proporção em relação aos fosfolipídios da membrana espermática, visando melhorar sua fluidez e resistência ao estresse térmico (BRINSKO et al., 2005; ELHORDOY et al., 2008; GRADY et al., 2009).

Os espermatozoides são vulneráveis e suscetíveis ao estresse oxidativo porque as membranas plasmáticas possuem grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados. Além de influenciar a resposta ao resfriamento e congelamento, a composição lipídica das membranas espermáticas desempenha um papel importante nas mudanças fisiológicas que levam à

fertilização. Ao longo das décadas, as pesquisas mostraram que o estresse oxidativo prejudica a função do espermatozoide, por exemplo, a motilidade espermática e a integridade da membrana plasmática (AITKEN, 1994; MAXWELL e WATSON, 1996; ARMSTRONG et al., 1999; BAUMBER et al., 2002).

A lipoperoxidação contribui para danificar a membrana lipídica do espermatozoide. Em diferentes espécies a suplementação com antioxidantes na dieta oral tem demonstrado melhorias na qualidade do sêmen. O estudo de BRINSKO et al. (2005) demonstrou que uma dieta rica em ácidos graxos ômega-3 (n-3) pode melhorar a motilidade dos espermatozoides resfriados e descongelados. Muitos dos produtos para ganhos têm baixos níveis de ácido docosahexaenóico (DHA) e são baseados em óleo de peixe, o que pode reduzir a palatabilidade. A vitamina E é o principal componente do sistema antioxidante dos espermatozoides e é considerada a principal protetora de membrana contra espécies reativas ao oxigênio (EROs) e peroxidação lipídica da membrana (AGARWAL et al., 2003; CONTRI et al., 2011). Esta característica resulta na neutralização de radicais lipídicos; por isso oferece proteção de componentes de membrana sem influenciar a geração de EROs (MARQUES et al., 2010). Vários estudos foram realizados em mamíferos para avaliar o efeito da adição de vitamina E em diluentes para congelamento com o objetivo de melhorar a qualidade do sêmen, mas resultados inconsistentes foram observados (FRANCO et al., 2013).

A adição de vitamina E ao diluente de congelamento melhorou a qualidade pós-descongelamento, além disso, a adição de α -tocoferol reduziu significativamente a peroxidação lipídica em espermatozoides equinos (AGÜERO et al., 1995; BALL e ANTHONY, 2002).

Nessa pesquisa avaliou-se o efeito de um suplemento alimentar na concentração de 70 g como fonte de ácido graxo ômega-3 de algas marinhas administrado diariamente via oral, bem como o efeito da Vitamina E (1 mM, DL- α -tocoferol), adicionada ao diluente de congelamento para sêmen de pôneis da raça Brasileira foi avaliado sobre a qualidade seminal e o estresse oxidativo, antes e após o congelamento do sêmen.

Material e métodos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria sob protocolo n° 9477300916.

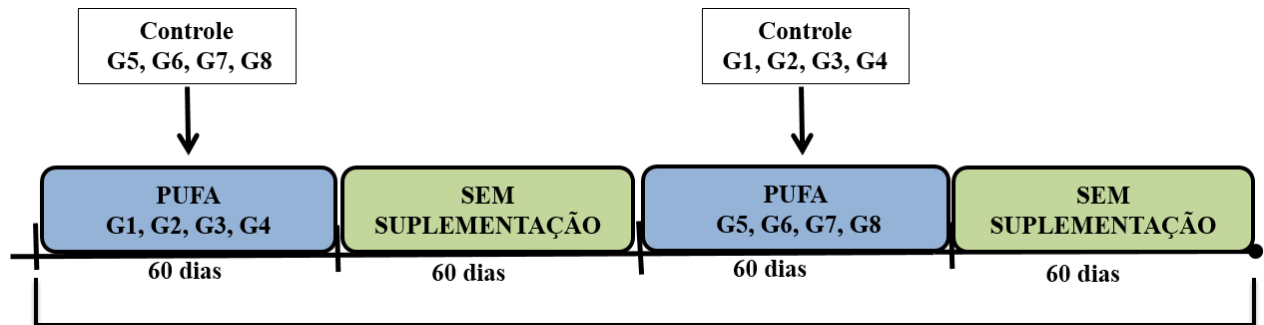
Animais

Nesta pesquisa foram utilizados 8 pôneis saudáveis e férteis da raça Brasileira com idade entre 9-16 anos pertencentes ao Laboratório de Embriologia Animal – Embryolab, da Universidade Federal de Santa Maria, (UFSM), Santa Maria/RS, Brasil (29°41’-03° Sul, 53°48’-25° Oeste). Os animais foram mantidos em um potreiro com sombreamento, pastagem cultivada e água canalizada *ad libitum*, na área do Hospital Veterinário Universitário da UFSM. No período de outubro de 2016 a maio de 2017, relativo as estações de primavera, verão e outono, os pôneis tiveram o sêmen coletado para compor a avaliação.

Suplementação

A alimentação compunha-se de aveia branca, ração e sal mineral. Inicialmente os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: Não suplementados (Controle, n=4) e Suplementados com suplemento de farinha de alga *Schizochytrium sp* rica em DHA (PUFA, n=4). A farinha de alga *Schizochytrium sp* rica em DHA continha níveis de extrato etéreo mínimo de 500g/kg e DHA mínimo de 120g/kg e os níveis recomendados pelo fabricante para inclusão na dieta de equinos era 0,5 kg a 10 kg por tonelada. Após o primeiro ciclo de suplementação (60 dias) e um período de descanso, os grupos de animais foram invertidos para remover o possível efeito residual da suplementação na espermatogênese, conforme Figura 1. As coletas de sêmen foram realizadas semanalmente e para as avaliações a cada 15 dias. Os pôneis receberam a dieta alimentar convencional não suplementada (grupo controle), ou a dieta alimentar convencional e a suplementação (Grupo PUFA) uma vez ao dia por 60 dias (KING et al., 2008, RODRIGUES et al., 2017). A suplementação (70 g) foi diluída em 120 mL de água potável fornecida através de seringa via oral.

Figura 1 – Desenho experimental da dieta alimentar convencional não suplementada (grupo controle) ou a dieta alimentar convencional e a suplementação com farinha de alga *Schizochytrium sp* rica em DHA (Grupo PUFA) fornecida uma vez ao dia por 60 dias para pôneis da raça Brasileira (G1 a G8).



Coletas de sêmen

Os pôneis tiveram as reservas gonadais esgotadas com duas coletas por semana durante 30 dias previamente ao início do experimento. As coletas de sêmen foram conduzidas com auxílio de uma vagina artificial modelo Hannover. Durante o experimento os machos foram coletados uma vez por semana com auxílio de uma pônei-manequim acondicionada à atividade e devidamente contida para garantir características estáveis do sêmen. Para análise estatística, o sêmen foi coletado a cada 15 dias dentro dos 60 dias de suplementação ou descanso. Durante a coleta, o sêmen foi filtrado com filtro de nylon acoplado ao copo coletor e a fração de gel foi desprezada.

Análise do sêmen

As análises macroscópicas do ejaculado como volume, coloração e aspecto foram conduzidas imediatamente após a coleta. Uma amostra do ejaculado fresco foi separada para avaliação do pH e concentração. O volume total do ejaculado foi diluído em diluente a base de leite em pó e glicose (EQUIDIL, Embryolab - UFSM) na proporção de 1:1 (sêmen:diluente). Na sequência, uma amostra foi retirada para análise do pH, da motilidade (total, progressiva e local) e vigor. O restante do ejaculado foi distribuído equitativamente em tubos para centrifugação a

400 x g por 10 minutos para remoção do plasma seminal. O pellet de cada tubo foi ressuspensionado com o diluente Botucurio® (Botucatu, São Paulo, Brasil) adicionado ou não de vitamina E (1 mM 1 mM, DL- α -tocoferol, T3376, Sigma-Aldrich) para congelamento do sêmen.

As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL com aproximadamente 100×10^6 spz/palheta e após seladas com álcool polivinílico. O congelamento foi realizado em aparelho automatizado TK 1000 (TK – Equipamentos para reprodução, Uberaba –MG) e as amostras armazenadas em nitrogênio líquido para processamento que ocorreu 3 meses após.

Avaliação pós-descongelamento

As palhetas de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos. O procedimento foi realizado com três palhetas de sêmen de cada pônei foram utilizadas para realizar as análises de motilidade total, progressiva e local, teste hiposmótico, porcentagem de espermatozoides vivos na coloração com eosina, integridade de membrana plasmática através de sondas fluorescentes (iodeto de propídio/diacetato de 6-carboxifluoresceína) e análise da motilidade espermática computadorizada (AndroVision, Minitub, Tiefenbach, Germany).

Motilidade espermática

A avaliação da motilidade espermática foi efetuada de acordo com Varner et al. (1989) através da determinação percentual de espermatozoides móveis no ejaculado e a caracterização do tipo de movimento a fresco, 24 h e 48 h de resfriamento. As amostras foram avaliadas sob microscópio de contraste de fase (200x e 400x) quanto ao movimento progressivo (MP), movimento local (ML) e imóveis (I), com 20 μ L de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C, de forma subjetiva, pelo mesmo observador.

Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada através de câmara de Neubauer retirando-se do ejaculado uma amostra de 50 μ L para adicioná-la um tubo contendo 9,95 mL de formol-salina. Após homogeneização montou-se a câmara de Neubauer preenchendo seus dois retículos.

Todos os espermatozoides presentes em 5 quadrados de cada retículo da câmara foram contados. Para a obtenção do número de espermatozoides por mL o cálculo foi realizado de acordo com altura, área da câmara e número de espermatozoides contados.

Teste de funcionalidade de membrana (HOST)

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pelo teste hiposmótico. As amostras foram incubadas a 37°C por oito minutos, de acordo com o protocolo de Lomeo e Giambérsio (1991) e adaptado para equinos por Lagares et al. (2000). Posteriormente, a análise foi conduzida sob microscópio de contraste de fase (400x), sob lâmina e lamínula contando 100 espermatozoides por amostra. Os espermatozoides íntegros foram considerados como aqueles que apresentaram enrolamento (edema) de cauda.

Integridade de membrana plasmática do espermatozoide através de microscopia de epifluorescência

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática foram utilizadas as sondas fluorescentes iodeto de propídeo (IP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A técnica adaptada da descrita por Harrison e Vickers (1990), contendo: solução de CFDA, solução de IP, solução de formaldeído e solução de citrato de sódio foi utilizada. Após 8 minutos de incubação a 37°C, uma gota de 3 µL da amostra foi colocada entre lâmina e lamínula e 200 células foram analisada sob microscópio de epifluorescência (1000x). Os espermatozoides corados em vermelho foram considerados com membrana não intacta (não viáveis) e os corados totalmente em verde foram considerados intactos e viáveis.

Análise computadorizada do sêmen

Uma pequena alíquota da amostra de sêmen foi colocada em uma lâmina aquecida com uma lamínula e avaliada usando o programa computadorizado CASA. Os parâmetros analisados incluíram porcentagem total de motilidade espermática (MT, %), motilidade progressiva (MP,

%), motilidade local (ML, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade média de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade retilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$), amplitude lateral da cabeça (ALH, μm) e frequência de batimentos (BCF, Hz).

Amostras de sangue e sêmen para análise dos ácidos graxos dos fosfolipídios através do TBARS

Amostras de sangue de cada pônei foram coletadas a cada 15 dias durante a execução do experimento em tubos de 5 mL contendo EDTA como anticoagulante pela punção da veia jugular direita ou esquerda. O sangue foi centrifugado imediatamente após a coleta a $1200 \times g$ por 15 minutos. O plasma foi coletado e armazenado em tubos de 2 mL a -80°C . Amostras de sêmen puro imediatamente após a coleta foram acondicionadas em tubos de 2 mL e armazenadas a -80°C .

Análise estatística

A análise estatística foi efetuada com o programa software SAS® (versão 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC). Os dados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e para comparação das médias utilizou-se o Teste de Tukey.

Resultados

Acredita-se que a suplementação com DHA proporcione ao sêmen a capacidade de suportar com maior eficiência as lesões causadas pelo congelamento e pelo estresse oxidativo. Esperava-se que a suplementação com DHA promovesse a melhoria da qualidade seminal dos pôneis suplementados a fresco e após o congelamento. Durante o experimento que constou de 112 coletas de sêmen no período de 180 dias, os valores médios para os parâmetros avaliados a fresco no grupo PUFA e controle foram similares e estão descritos na Tabela 1. Os valores médios da motilidade total, progressiva e local, hiposmótico, CFDA/PI e análise computadorizada de sêmen de pôneis da raça Brasileira suplementados com DHA e o grupo controle pós-descongelamento não diferiram e estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1 - Volume, concentração, pH, vigor motilidade total, progressiva e local de sêmen de pôneis da raça Brasileira suplementados com ácido docosahexaenóico (DHA; médias \pm desvio padrão).

Parâmetros seminais	Controle	PUFA
Volume	22,29 \pm 12,99	24,66 \pm 13,60
Concentração	267,16 \pm 127,18	293,75 \pm 132,66
pH	7,58 \pm 0,28	7,56 \pm 0,19
Vigor	3,46 \pm 0,50	3,44 \pm 0,60
Motilidade Total (%)	70,34 \pm 5,6	71,94 \pm 6,24
Motilidade Progressiva (%)	64,65 \pm 6,3	66,11 \pm 7,18
Motilidade Local (%)	5,69 \pm 1,75	5,83 \pm 1,88

ANOVA, Teste de Tukey, $P > 0.05$

Tabela 2 - Motilidade total, progressiva e local, funcionalidade da membrana plasmática através do teste hiposmótico, integridade da membrana plasmática através de coloração com CFDA/PI e análise computadorizada de sêmen pós-descongelamento de pôneis da raça Brasileira suplementados com ácido docosahexaenóico (médias \pm desvio padrão).

Avaliações	Controle	PUFA
Motilidade Total (%)	50,35 \pm 15,20	51,94 \pm 17,54
Motilidade Progressiva (%)	25,89 \pm 12,75	29,43 \pm 17,49
Motilidade Local (%)	24,02 \pm 8,64	22,52 \pm 9,59
Hiposmótico (%)	38,16 \pm 7,72	40,78 \pm 9,22
CFDA/PI (%)	53,57 \pm 8,84	54,68 \pm 8,47
Amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm)	0,8 \pm 0,23	0,82 \pm 0,22
Frequência de Batimentos (BCF, Hz)	10,82 \pm 3,76	11,75 \pm 5,53
Velocidade de Trajeto (VAP, μm/s)	31,87 \pm 10,55	35,73 \pm 18,12
Velocidade Curvilínea (VCL μm/s)	66,80 \pm 21,73	69,52 \pm 25,83
Velocidade Progressiva (VSL, μm/s)	25,97 \pm 9,17	27,97 \pm 13,29

ANOVA, Teste de Tukey, $P > 0.05$

A associação da suplementação de DHA e Vitamina E adicionada ao diluente não potencializou a capacidade antioxidante do diluente durante o congelamento. Os valores dos parâmetros avaliados pós-descongelamento do sêmen que foi congelado com vitamina E adicionado ao diluente estão descritos na Tabela 3. A associação da suplementação de DHA e Vitamina E adicionada ao diluente resultou em diminuição da motilidade total e progressiva seminal comparada ao grupo não suplementado (controle).

Tabela 3 - Motilidade total, progressiva e local, funcionalidade da membrana plasmática através do teste hiposmótico, integridade da membrana plasmática através de coloração com CFDA/PI e análise computadorizada de sêmen de pôneis da raça Brasileira suplementados com DHA pós-descongelamento e com 1 mM de Vitamina E adicionada ao diluente de congelamento (médias \pm desvio padrão).

Avaliações	Controle	PUFA + Vitamina E
Motilidade Total (%)	50,07 \pm 15,43 ^a	39,15 \pm 15,76 ^b
Motilidade Progressiva (%)	27,21 \pm 14,08 ^a	19,05 \pm 11,22 ^b
Motilidade Local (%)	22,85 \pm 7,15	20,10 \pm 7,77
Hiposmótico (%)	38,00 \pm 8,00	35,95 \pm 7,55
CFDA/PI (%)	51,47 \pm 9,36	52,39 \pm 10,64
Amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm)	0,77 \pm 0,29	0,67 \pm 0,22
Frequência de Batimentos (BCF, Hz)	11,31 \pm 4,72	12,04 \pm 13,41
Velocidade de Trajeto (VAP, μm/s)	31,06 \pm 12,74	28,7 \pm 16,49
Velocidade Curvilinear (VCL μm/s)	65,51 \pm 27,46	54,85 \pm 19,60
Velocidade Progressiva (VSL, μm/s)	25,98 \pm 11,09	21,42 \pm 8,35

^{a, b} Letras diferentes indicam diferença ($P < 0.05$) nas linhas.

Discussão

O congelamento e o descongelamento induzem a morte celular e também danos sutis na maioria das células da população sobrevivente, levando a uma vida útil reduzida no trato reprodutivo feminino ou *in vitro* (ORTEGA-FERRUSOLA, et al., 2009). As diferenças na congelabilidade entre gananhões pode ser afetada pela composição da membrana plasmática do espermatozoide (PEÑA et al., 2011; MARCIAS-GARCIA et al., 2011). A criopreservação causa danos físicos e químicos letais ou moderados nas membranas dos espermatozoides (WATSON, 2000) e isso pode ser atribuído a alterações na transição de fase lipídica, aumento na peroxidação lipídica induzida por espécies reativas de oxigênio e estresse mecânico devido as mudanças de osmolaridade e temperatura (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009). Para desenvolver esta pesquisa formulou-se a hipótese que a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados e vitamina E pela membrana do espermatozoide melhora sua viabilidade, ou seja, melhora a capacidade do sêmen para manter sua integridade e funcionalidade durante o processo de congelamento.

O volume total do ejaculado, excluída a fração gel, não foi afetado pela suplementação com DHA no grupo de animais do nosso estudo. Achados semelhantes foram verificados em gananhões (BRINSKO et al., 2005), cabritos (DOLATPANAH et al., 2008), búfalos (ADEEL et al., 2009), suínos (YESTE et al., 2011), touros (GHOLAMI et al., 2010) e carneiros (FAIR et al., 2014). No entanto, Strzezek et al. (2000) observaram que a suplementação de ácidos graxos insaturados teve efeito positivo no volume de sêmen em javalis.

Conduzidas as rotinas de coleta observou-se que as médias do pH do sêmen entre os pôneis suplementados e não suplementados foi similar. Os achados de que não houve incremento na motilidade espermática total e progressiva após a suplementação com PUFA ômega 3 na dieta é consistente com as pesquisas desenvolvidas em gananhões (BRINSKO et al., 2005, HARRIS et al., 2005), javalis (STRZEZEK et al., 2004, YESTE et al., 2011), frangos de corte (SURAI et al., 2000) e perus (ZANIBONI et al., 2006). Nas referidas espécies não houve evidência de efeito positivo da suplementação dietética de ácidos graxos de cadeia longa na motilidade do sêmen fresco. No entanto, na pesquisa de Gholami et al. (2010) com touros, maior motilidade total e progressiva foi detectada na avaliação por CASA. Sabe-se que a avaliação subjetiva realizada sob microscópio por avaliadores pode não ser tão precisa quanto a observação através de computadores e ser passível de erros. Portanto, as diferenças inferiores a 5% de precisão que são

difíceis de serem observadas nas avaliações de motilidade a fresco não puderam ser bem demonstradas no presente estudo.

As médias da concentração espermática no presente estudo também foram similares entre os pôneis com ou sem a suplementação alimentar. A suplementação com antioxidantes adicionados na dieta de garanhões melhorou a qualidade do sêmen (CONTRI et al., 2011), entretanto alguns resultados inconsistentes também já foram relatados (DEISCHSEL et al., 2008). Por outro lado, a pesquisa com garanhões suplementados com ácidos graxos ômega 3 de cadeia longa (HARRIS et al., 2005) apresentou relato diferente, pois as características de movimento dos espermatozoides frescos e dos espermatozoides resfriados e armazenados não resultaram em melhorias pelo tratamento.

A produção de ROS e os consequentes danos nos espermatozoides aumentam durante o processamento e conservação do sêmen, levando a diminuição significativa da fertilidade (BALL, 2008; BANSAL e BILASPURI, 2011). Em nosso experimento, a motilidade espermática pós-descongelamento não foi influenciada pela suplementação com DHA o que também ocorreu em suínos (PAULENZ et al., 1999; MALDJIAN et al., 2005; CASTELLANO et al., 2010) e em garanhões (GRADY et al., 2009), pois a qualidade do sêmen não melhorou quando a dieta foi suplementada com PUFA ômega 3. O estudo com garanhões com baixa qualidade seminal após congelamento suplementados diariamente com ácidos graxos ômega 3 e vitamina E via oral também revelou similaridade na porcentagem de motilidade total ou progressiva após o descongelamento (GEE et al., 2010). Os dados de motilidade de espermatozoides pós-descongelamento avaliados de forma subjetiva e por CASA não diferiram em touros suplementados ou não (GHOLAMI et al., 2010). Estudos conduzidos na década passada com a alimentação com 250 g de um nutracêutico comercial enriquecido com DHA por 14 semanas melhorou a motilidade dos espermatozoides de garanhões após 48 h de criopreservação (BRINSKO et al., 2005; ELHORDOY et al., 2008) e após 80 dias de suplementação com 29 g de ômega 3 no sêmen após descongelamento (HARRIS et al., 2005).

Na presente pesquisa, as avaliações da membrana plasmática pelo teste hiposmótico revelou similaridade entre os grupos suplementados e não suplementados corroborando os achados de Gholami et al. (2010) que não detectaram mudanças em espermatozoides de touros suplementados com DHA pós-descongelamento. Este fato pressupõe que a dose utilizada, a fonte,

ou o período de suplementação conduzidos em nossa pesquisa não foram suficientes para melhorar a integridade da membrana dos espermatozoides após o congelamento.

A incorporação de PUFA na dieta demonstrou ter sido efetiva em várias espécies. Brinsko et al. (2007) sugeriram que a ingestão de ácidos graxos ômega 3 pode alterar a proporção de colesterol:fosfolipídios da membrana plasmática do espermatozoide. A suplementação de cavalos com nutracêuticos ricos em DHA gerou aumento triplo no DHA do sêmen após 14 semanas de tratamento (BRINSKO et al., 2005). A suplementação comercial oral com óleo de arroz por 80 dias contendo PUFA e gama-orizanol aumentou o potencial antioxidante total, maior funcionalidade e motilidade da membrana do sêmen de garanhões (ARLAS et al., 2008). A suplementação com um nutracêutico contendo ácidos graxos resultou no aumento da produção de espermatozoides (HARRIS et al., 2005). As dietas suplementadas com óleo de peixe modificaram o perfil de ácidos graxos do plasma sanguíneo e dos espermatozoides, em particular aumentou a proporção de DHA (CASTELLANO et al., 2010). A suplementação dietética de óleo de peixe rica em ômega 3 FA, EPA e DHA parece ter efeitos benéficos em cavalos, incluindo melhora na qualidade do sêmen (HUANG et al., 2010), porém em nossa pesquisa fazendo uso de um suplemento a base de algas esses efeitos não foram identificados.

Garanhões alimentados com um composto rico em ácidos graxos ômega 3 tiveram aumento na produção de espermatozoides, características de motilidade, morfologia e fertilidade de alguns garanhões (BRINSKO et al., 2005; HARRIS et al., 2005). Nos garanhões, a alimentação com DHA teve uma influência positiva sobre a motilidade do sêmen armazenado e congelado-descongelado (HARRIS et al., 2005; BRINSKO et al., 2005). Em coelhos, a modificação nutricional da composição de lipídios espermatozoides pela suplementação com linhaça aumentou a integridade da membrana e a viabilidade dos espermatozoides (MOURVAKI et al., 2010).

A pesquisa avaliou a adição de 250 g e 30 g de DHA na dieta de garanhões resultou em efeito positivo na qualidade do sêmen 48 h após resfriamento e após o descongelamento (ELHORDOY et al., 2008; BRINSKO et al., 2005). Em nosso experimento administrou-se a quantidade de 70 g do suplemento para os pôneis o que corresponde a aproximadamente 8 g de DHA/dia o que pode não ter sido suficiente para promover aumento na viabilidade do sêmen após coleta e congelamento.

No nosso estudo, a adição de 1 mM de vitamina E ao diluente de congelamento não melhorou a viabilidade dos espermatozoides após descongelamento corroborando com Franco et al., (2014) que com a adição de 2 mM de vitamina E ao diluente de congelamento não resultou em melhorias na qualidade do sêmen após congelamento. Baumber et al., (2005) observaram que a adição de α -tocoferol e ácido ascórbico ao diluente de criopreservação não melhorou a qualidade dos espermatozoides equinos após o descongelamento, demonstrando nenhum efeito na manutenção da motilidade ou fertilidade durante o armazenamento. Além disso, em outro estudo com garanhões (BRINSKO et al., 2005), a alimentação de um ácido graxo omega-3 sob a forma de um nutracêutico comercialmente disponível que também continha um precursor de vitamina E resultou em melhora significativa da motilidade do sêmen quando o armazenamento se deu por resfriamento a 5°C por 48 horas, bem como quando descongelado. Franco et al. (2013) concluíram que α -tocoferol é um antioxidante eficaz para reduzir o estresse oxidativo provocado pela criopreservação, diminuindo a peroxidação lipídica em espermatozoides equinos.

Em 2005, Brinsko e colaboradores testaram o efeito da suplementação rica em DHA no sêmen fresco, resfriado e congelado e concluíram que garanhões altamente férteis ou aqueles que produzem espermatozoides que toleram o resfriamento não necessitam ser suplementados. Já os garanhões de fertilidade marginal, bem como aqueles cujos espermatozoides têm baixa tolerância ao resfriamento e congelamento seriam cavalos com possibilidade de se beneficiar da suplementação com DHA, pois a qualidade do sêmen pode melhorar suficientemente e torna-los comercialmente aceitáveis para resfriamento e congelamento. O estudo desenvolvido por Gholami et al. (2010) que versa sobre a suplementação de DHA ou seus precursores à alimentação melhorou a qualidade in vitro e a motilidade do sêmen fresco em touros da raça Holandesa, porém este efeito não foi tão pronunciado após o congelamento.

Em nossa pesquisa ao avaliarmos o efeito da suplementação oral de 70 g de farinha de alga *Schizochytrium sp* rica em DHA por 60 dias sob a motilidade, teste hiposmótico, integridade de membrana e avaliação computadorizada do sêmen de pôneis da raça Brasileira resultou que a quantidade utilizada bem como o período de tempo não foi suficiente para promover melhoria na viabilidade seminal após a coleta do sêmen ou mesmo após o descongelamento. Da mesma forma que a inclusão de 1 mM de vitamina E ao diluente de congelamento associada a suplementação de sêmen em pôneis da raça Brasileira não foi eficiente para promover melhoria na viabilidade seminal após a coleta ou mesmo após o descongelamento do sêmen. Porém, o grupo de animais

disponível para a pesquisa apresentava boa qualidade seminal podendo não se beneficiar da suplementação de DHA ou vitamina E. Experimentos adicionais podem ser realizados utilizando a suplementação em pôneis com baixa qualidade espermática ou aumentando a dose da suplementação. Outro fator que pode ter influenciado nos resultados foi a baixa palatabilidade do suplemento.

Conclusão

A suplementação de 70 g de farinha de alga *Schizochytrium sp* rica em DHA e ou a inclusão de 1 mM de vitamina E ao diluente de congelamento de sêmen em pôneis da raça Brasileira não foi eficiente para promover melhoria na viabilidade seminal após a coleta ou mesmo após o descongelamento.

Referências

ADEEL, M. et al. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1220-1225, 2009.

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 4, p. 829-843, 2003.

AITKEN, R. J. Pathophysiology of human spermatozoa. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, v. 6, n. 2, p. 128-135, 1994.

ARLAS, T. R. et al. Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 306, 2008.

ARMSTRONG, J. S. et al. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 7-8, p. 869-880, 1999.

AZIZ, D. M.; AHLWEDE, L.; ENBERGS, H. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1350-1356, 2005.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 257-267, 2008.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2011.

BAUMBER, J. et al. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1025-1033, 2002.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 5, p. 772-779, 2005.

BRINSKO, S. P. et al. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1519-1527, 2005.

BRINSKO, S. P. et al. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1-2, p. 65-71, 2007.

CASTELLANO, C.-A. et al. Effect of dietary n-3 fatty acids (fish oils) on boar reproduction and semen quality 1. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 7, p. 2346-2355, 2010.

CONTRI, A. et al. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1319-1326, 2011.

DEICHSEL, K. et al. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 940-945, 2008.

DOLATPANAHA, M. B. et al. Effects of dietary fish oil on semen quality of goats. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 21, n. 1, p. 29, 2008.

ELHORDOY, D. M. et al. Effect of dietary supplementation with DHA on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 319, 2008.

FAIR, S. et al. The effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation of rams on semen quality and subsequent quality of liquid stored semen. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 210-219, 2014.

FRANCO, J. S. V. et al. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 10, p. 787-793, 2013.

FRANCO, J. S. V.; CHAVEIRO, A.; DA SILVA, F. M.. Effect of freezing rates and supplementation of α -tocopherol in the freezing extender in equine sperm cryosurvival. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 8, p. 992-997, 2014.

GARMSIR, A. K. et al. Effects of dietary Thyme (*Thymus vulgaris*) and fish oil on semen quality of miniature Caspian horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 9, p. 1069-1075, 2014.

GEE, E. K., et al. Effects on spermatozoa of dietary supplementation of vitamin E and omega-3 fatty acids in stallions with poor post-thaw motility. **Animal Reproduction Science**, v.121, p.206-207, 2010.

GIBB, Z.; AITKEN, R. J. The impact of sperm metabolism during in vitro storage: the stallion as a model. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

GHOLAMI, H. et al. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1548-1558, 2010.

GRADY, S. T. et al. Dietary supplementation of 2 sources of omega-3 fatty acids and subsequent effects on fresh, cooled, and frozen seminal characteristics of stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 5, p. 333-334, 2009.

HARRIS, M. A. et al. Stallion spermatozoa membrane phospholipid dynamics following dietary n-3 supplementation. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 234-237, 2005.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.

LAGARES, M. A. et al. Assessing equine sperm-membrane integrity. **Andrologia**, v. 32, n. 3, p. 163-167, 2000.

LOMEO, A. M.; GIAMBERSIO, A. M. 'Water-test': a simple method to assess sperm-membrane integrity. **International Journal of Andrology**, v. 14, n. 4, p. 278-282, 1991.

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1-2, p. 119-128, 2008.

MACÍAS GARCÍA, B. et al. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 141-148, 2011.

MALDJIAN, A.; PENNY, P.; NOBLE, R. C. Docosahexaenoic acid-rich marine oils and improved reproductive efficiency in pigs. **Male fertility and lipid metabolism** (ed. AB Christophe and SR De Vriese), p. 60-72, 2003.

MALDJIAN, A. et al. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 411-421, 2005.

MARQUES, A. et al. Effect of α -tocopherol on Bovine in Vitro Fertilization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 81-85, 2010.

MAXWELL, W. M. C.; WATSON, P. F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1-4, p. 55-65, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURVAKI, E. et al. Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 629-637, 2010.

ORTEGA-FERRUSOLA, C. et al. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, n. 1, p. 55-63, 2009.

KING, S. S. et al. Circulating fatty acid profiles in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses¹. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 5, p. 1114-1123, 2008.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.

PAULENZ, H. et al. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 5, p. 431-435, 1999.

PEÑA, F. J. et al. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols?. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1177-1186, 2011.

PENNY, P. C. et al. Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. **Pig News and Information**, v. 21, n. 4, 2000.

RODRIGUES, P. G. et al. Dietary Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation Improves the Quality of Stallion Cryopreserved Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 54, p. 18-23, 2017.

SCHMID-LAUSIGK, Y.; AURICH, C. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 966-973, 2014.

STRZEŻEK, J. et al. Effect of depletion tests (DT) on the composition of boar semen. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 949-963, 2000.

STRZEZEK, J. et al. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. **Reproduction and Biology**, v. 4, n. 3, p. 271-287, 2004.

SURAI, P. F. et al. Effect of long-term supplementation with arachidonic or docosahexaenoic acids on sperm production in the broiler chicken. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, n. 2, p. 257-264, 2000.

VARNER, D. D. et al. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20° C. **Theriogenology**, v. 32, n. 4, p. 515-525, 1989.

ZANIBONI, L; RIZZI, R; CEROLINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1813-1827, 2006.

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

YESTE, Marc et al. The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 184-196, 2011.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o intuito de identificar um tampão de pH para armazenamento e transporte de sêmen de pôneis da raça Brasileira que proporcione alta viabilidade espermática, após a identificação da concentração dos tampões na faixa de pH adequado testou-se o resfriamento a 5°C e a 15°C e evidenciando-se que tanto BES, MES ou TES podem ser utilizados no armazenamento e transporte do sêmen de pôneis durante 48 h a 5°C ou 15°C.

Esperava-se que a suplementação com DHA promovesse a melhoria da qualidade seminal dos pôneis suplementados tanto do sêmen a fresco como após o congelamento. A suplementação de 70 g de farinha de alga *Schizochytrium sp* rica em DHA por 60 dias e ou a inclusão de 1 mM de vitamina E ao diluente de congelamento de sêmen em pôneis da raça Brasileira não foi eficiente para promover melhoria na viabilidade seminal após a coleta ou mesmo após o descongelamento. A condução de testes com maiores doses da suplementação e animais com baixa qualidade seminal seria oportuna para corroborar a hipótese de melhoria da qualidade seminal.

REFERÊNCIAS

- ADEEL, M. et al. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1220-1225, 2009.
- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 4, p. 829-843, 2003.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.; ALLAMANENI, S. S. S. R. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 12, n. 5, p. 630-633, 2006.
- AGUEERO, A. et al. Effect of vitamin E addition in equine sperm preservation. **Comunicaciones Biologicas**, v. 13, p. 343-356, 1995.
- AITKEN, R. J.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, n. 1, p. 15-24, 2008.
- ALBRIZIO, M. et al. Localization and functional modification of L-type voltage-gated calcium channels in equine spermatozoa from fresh and frozen semen. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 421-429, 2015.
- ALMEIDA, J.; BALL, B. A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 3-4, p. 321-337, 2005.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 5-17. e3, 2014.
- AMIRAT, L. et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 895-907, 2004.
- ARLAS, T. R. et al. Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 306, 2008.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 65-75, 2005.
- AURICH, C.; SPERGSEER, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 912-918, 2007.

- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 268-275, 2008.
- AURICH, C. **Semen Extenders for Cooled Semen (Europe)**. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (ed), Equine reproduction, vol 1, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Chichester, United Kingdom, cap.131, p.1336-1340, 2011.
- AVANZI, B. R. et al. Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas. **Veterinária e Zootecnia**, p. 226-238, 2011.
- AZIZ, D. M.; AHLWEDE, L.; ENBERGS, H. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. **Theriogenology**, v. 64, n. 6, p. 1350-1356, 2005.
- BALL, B. A.; ANTHONY, V. O. 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.
- BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 2011.
- BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell and Tissue Banking**, v. 10, n. 1, p. 49-62, 2009.
- BATELLIER, F. et al. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, n. 3, p. 391-410, 1997.
- BATELLIER, F. et al. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 181-190, 2001.
- BAUMBER, J. et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.
- BERGERON, A.; MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 10, p. 1338-1344, 2006.
- BRENDEMUEHL, J. P.; KOPP, K.; ALTMAN, J. Influence of dietary algal N-3 fatty acids on breeding induced inflammation and endometrial cytokine expression in mares bred with frozen semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 1, p. 123-124, 2014.
- BRÉQUE, C.; SURAI, P.; BRILLARD, J. P. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 66, n. 3, p. 314-323, 2003.

- BRINKERHOFF, J. M. et al. Influence of mare age, pre-breeding mare status, breeding method, and stallion on first-cycle pregnancy rates on a large commercial breeding farm. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 159, 2010.
- BRINSKO, S. P. et al. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1519-1527, 2005.
- BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 249-264, 2007.
- BROWN, K.I.; GRAHAM, E.F.; CRABO, B.G. Effect of some hydrogen ion buffers on storage and freezing of turkey spermatozoa. **Poultry Science**, v.51 (3), p.840–849, 1972.
- BUCAK, M. N. et al. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminant Research**, v. 89, n. 1, p. 24-30, 2010.
- BÜYÜKLEBLEBICI, S. et al. Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. **Animal Reproduction Science**, v. 150, n. 3-4, p. 77-83, 2014.
- CÂMARA, D. R. et al. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 342-350, 2011.
- CARD, C.. Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 558-567, 2005.
- CASELLES, A. B. et al. Identification of apoptotic bodies in equine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 2, p. 254-262, 2014.
- CASTELLINI, C. et al. Oxidative status and semen characteristics of rabbit buck as affected by dietary. **Reproduction Nutrition Development**, v. 43, n. 1, p. 91-103, 2003.
- CEROLINI, S. et al. Effect of docosahexaenoic acid and α -tocopherol enrichment in chicken sperm on semen quality, sperm lipid composition and susceptibility to peroxidation. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 877-886, 2006.
- CONTRI, A. et al. Efficiency of different extenders on cooled semen collected during long and short day length seasons in Martina Franca donkey. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1-4, p. 136-141, 2010.
- CONTRI, A. et al. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1319-1326, 2011.
- CRABO, B. G.; BROWN, K. I.; GRAHAM, E. F. Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 35, n. 2, p. 377-382, 1972.

DAD, S. et al. Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. **Free Radical Research**, v. 40, n. 3, p. 333-338, 2006.

DARENIUS, A. **Experiences with chilled, transported equine semen.** In: Stallion Reproduction Symposium, Proceedings of American Association of Equine Practitioners, Montgomery, AL: Society for Theriogenology, American Association of Equine Practitioners, p.60-70, 1998.

DE OLIVEIRA, R. A. et al. Cooled-storage of equine semen does not induce major changes in sperm DNA methylation. **Theriogenology**, v. 89, p. 289-294, 2017.

DEICHSEL, K. et al. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 940-945, 2008.

DOTT, H. M.; FOSTER, G. C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 29, n. 3, p. 443-445, 1972.

DOWNS, S. M.; MASTROPOLO, A. M. Culture conditions affect meiotic regulation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, n. 4, p. 551-566, 1997.

ECOT, P. et al. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, n. 56, p. 141-150, 2000.

ELHORDOY, D. M. et al. Effect of dietary supplementation with DHA on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 319, 2008.

FERGUSON, W J. et al. Hydrogen ion buffers for biological research. **Analytical Biochemistry**, v. 104, n. 2, p. 300-310, 1980.

ORTEGA-FERRUSOLA, C. et al. Detection of "Apoptosis-Like" Changes During the Cryopreservation Process in Equine Sperm. **Journal of Andrology**, v. 29, n. 2, p. 213-221, 2008.

ORTEGA-FERRUSOLA, C. Ortega et al. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, n. 1, p. 55-63, 2009.

ORTEGA-FERRUSOLA, C. Ortega et al. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces "apoptosis like" changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 458-465, 2010.

FONSECA, J. F. et al. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 139-144, 2005.

- FRANCO, J. S. V. et al. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 10, p. 787-793, 2013.
- GARCÍA, B. M. et al. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 811-818, 2011.
- GHOLAMI, H. et al. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1548-1558, 2010.
- GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; AITKEN, R. J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 3, p. 77, 1-10, 2014.
- GOEDDE, L. D. et al. 129 Effects of feeding a yeast-based supplement containing selenized yeast, vitamin E and a DHA-rich microalgae on sperm motion characteristics. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 5, p. 438, 2015.
- GOOD, N. E. et al. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 467-477, 1966.
- GRADY, S. T. et al. Dietary supplementation of 2 sources of omega-3 fatty acids and subsequent effects on fresh, cooled, and frozen seminal characteristics of stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 5, p. 333-334, 2009.
- GRAHAM, E. F.; CRABO, B. G.; BROWN, K. I. Effect of Some Zwitter Ion Buffers on the Freezing and Storage of Spermatozoa I. Bull1. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 3, p. 372-378, 1972.
- GRIGGERS, S. et al. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 613-622, 2001.
- GURR, M. I. et al. **Lipid biochemistry**. Oxford, UK: Blackwell Science, 2002.
- HARRIS, M. A. et al. Stallion spermatozoa membrane phospholipid dynamics following dietary n-3 supplementation. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 234-237, 2005.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1, p. 343-352, 1990.
- HATAMOTO, L. K. et al. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, n. 6, p. 1610-1614, 2006.
- HESS, T. M., et al.. Effects of U-3 (n-3) fatty acid supplementation on insulin sensitivity in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, p. 1-11, 2012

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

HOLT, W. V.; VAN LOOK, K. J. W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 527-535, 2004.

JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 129-148, 1992.

JEYENDRAN, R. S. et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.

JOHANNISSON, A. et al. Naturally and stimulated levels of reactive oxygen species in cooled stallion semen destined for artificial insemination. **Animal**, v. 8, n. 10, p. 1706-1714, 2014.

JONES, R. C.; FOOTE, R. H. Effect of Osmolality and Phosphate, 'Tris', 'Tes', 'Mes', and 'Hepes' Hydrogen Ion Buffers on the Motility of Bull Spermatozoa Stored At 37 Or 5° C. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 5, p. 1047-1056, 1972.

KENNEY, R.M. et al. **Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings**. In: Proceedings of the 21st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, p.327, 1975.

KIRK, E. S.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 317, 2001.

KRAKOWSKI, L. et al. Assessment of extent of apoptosis and DNA defragmentation in chilled semen of stallions during the breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 5, p. 826-832, 2013.

LAGARES, M. A. et al. Assessing equine sperm-membrane integrity. **Andrologia**, v. 32, n. 3, p. 163-167, 2000.

LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 4, p. 643-656, 1997.

LIPPMEIER, J. C. et al. Characterization of both polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathways in *Schizochytrium* sp. **Lipids**, v. 44, n. 7, p. 621-630, 2009.

LOMEO, A. M.; GIAMBERSIO, A. M. 'Water-test': a simple method to assess sperm-membrane integrity. **International Journal of Andrology**, v. 14, n. 4, p. 278-282, 1991.

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1-2, p. 119-128, 2008.

LOVE, C. C. et al. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1135-1142, 2002.

LOVE, C. C. et al. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1584-1591, 2005.

LOVE, C. C. et al. **Effect of inter-stallion seminal plasma variability on motility, viability, and DNA integrity of cauda epididymal sperm.** In: Proceedings 10th International Symposium Equine Reproduction, Animal Reproduction Science. p. S191, 2010.

LOVE, C. C. et al. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. **Theriogenology**, v. 77, n. 9, p. 1911-1917, 2012.

LOVE, C. C. Modern techniques for semen evaluation. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 531-546, 2016.

MAGISTRINI, M. et al. Fertility prediction in stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 42, n. 1, p. 181-188, 1996.

MALDJIAN, A.; PENNY, P.; NOBLE, R. C. Docosahexaenoic acid-rich marine oils and improved reproductive efficiency in pigs. **Male fertility and lipid metabolism (ed. AB Christophe and SR De Vriese)**, p. 60-72, 2003.

MARQUES, A. et al. Effect of α -tocopherol on Bovine in Vitro Fertilization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 81-85, 2010.

MAZIERO, R. R. D. et al. Evaluation of sperm kinetics and plasma membrane integrity of frozen equine semen in different storage volumes and freezing conditions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 3, p. 165-168, 2013.

MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 1, p. 71-78, 1999.

MEYER, H.; FLOTHOW, C.; RADICKE, S. Preileal digestibility of coconut fat and soybean oil in horses and their influence on metabolites of microbial origin of the proximal digestive tract. **Archives of Animal Nutrition**, v. 50, n. 1, p. 63-74, 1997.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1-2, p. 104-118, 2008.

MOLINIA, F. C.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. In vitro evaluation of zwitterion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. **Reproduction Nutrition Development**, v. 34, n. 5, p. 491-500, 1994.

- MOLINIA, F. C.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Fertility of ram spermatozoa pellet-frozen in zwitterion-buffered diluents. **Reproduction Nutrition Development**, v. 36, n. 1, p. 21-29, 1996.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v. 51, n. 3, p. 241-249, 2005.
- MOORE, A. I. et al. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 5, p. 215-218, 2006.
- MORRIS, G. J. et al. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 804-812, 2007.
- MOURVAKI, E. et al. Effects of flaxseed dietary supplementation on sperm quality and on lipid composition of sperm subfractions and prostatic granules in rabbit. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 629-637, 2010.
- MOUSSA, M. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1695-1706, 2002.
- NEILD, D. M. et al. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia**, v. 32, n. 6, p. 351-355, 2000.
- NEILD, D. N. et al. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 47-56, 2005.
- NEURINGER, M.; ANDERSON, G. J.; CONNOR, W. E. The essentiality of n-3 fatty acids for the development and function of the retina and brain. **Annual Review of Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 517-541, 1988.
- O'CONNOR, M. T.; AMANN, R. P.; SAACKE, R. G. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standard laboratory tests and their use for predicting fertility. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 5, p. 1368-1376, 1981.
- O'FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, n. 5, p. 269-275, 1997.
- PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.
- PAULENZ, H. et al. Effect of different extenders on sperm viability of buck semen stored at room temperature. **Small Ruminant Research**, v. 59, n. 1, p. 89-94, 2005.

PETRUNKINA, A. M. et al. Volume regulatory function and sperm membrane dynamics as parameters for evaluating cryoprotective efficiency of a freezing extender. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1390-1406, 2005.

PEÑA, F. J. et al. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols?. **Theriogenology**, v. 76, n. 7, p. 1177-1186, 2011.

PENNY, P. C. et al. Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. **Pig News and Information**, v. 21, n. 4, 2000.

QUINTELA, A. T. et al. Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. **Animal Reproduction**, v. 7, n. 2, p. 70-74, 2017.

RADOMIL, L. et al. Stress and dietary factors modify boar sperm for processing. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. s2, p. 39-44, 2011.

RASHEDI, M.; FAZELI, M. H.; BAHREINI, M. Polymyxin B changes the plasma membrane integrity of cryopreserved bull semen. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 5, n. 5, p. 411-415, 2016.

RASUL, Z. et al. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 59, n. 1-2, p. 31-41, 2000.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 91-101, 2006.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 68, p. S138-S146, 2007.

RODRIGUEZ, A. M. et al. Tumor necrosis factor α phosphorylates c-Jun N-terminal kinase in stallion spermatozoa: effect of cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 3, p. 206-212, 2015.

SALAZAR, J. L. et al. Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 409-418, 2011.

SCHMID-LAUSIGK, Y.; AURICH, C. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. **Theriogenology**, v. 81, n. 7, p. 966-973, 2014.

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

STEPHENS, T. D. et al. Effects of pentoxifylline, caffeine, and taurine on post-thaw motility and longevity of equine frozen semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 8, p. 615-621, 2013.

SURAI, P. et al. Effect of vitamin E and selenium supplementation of cockerel diets on glutathione peroxidase activity and lipid peroxidation susceptibility in sperm, testes, and liver. **Biological Trace Element Research**, v. 64, n. 1-3, p. 119-132, 1998.

TAPIA, J. A. et al. The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s3, p. 65-75, 2012.

VARNER, D. D. et al. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20° C. **Theriogenology**, v. 32, n. 4, p. 515-525, 1989.

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

VEERAMACHANENI, D. N. R.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R. Sperm morphology in stallions: ultrastructure as a functional and diagnostic tool. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 683-692, 2006.

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

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

WILL, M. A.; CLARK, N. A.; SWAIN, J. E. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 8, p. 711-724, 2011.

YÁÑIZ, J. L.; MATEOS, J. A.; SANTOLARIA, P. Zwitterionic buffers preserve ram semen quality more efficiently than TRIS during storage at 15° C. **Small Ruminant Research**, v. 95, n. 1, p. 54-60, 2011.

ZANEVELD LJD, et al. **Hypoosmotic swelling test**. In: Acosta AA, Swanson RJ, Ackerman SB, Kruger TF, Van Zyl JA, Menkveld R, editors. Human spermatozoa in assisted reproduction. Philadelphia: Williams and Wilkins; p. 223-227, 1990.

ZANIBONI, L; RIZZI, R; CEROLINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. **Theriogenology**, v. 65, n. 9, p. 1813-1827, 2006.