

USO DE QUERCETINA EM MEIO DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO A BASE DE LEITE EM PÓ DESNATADO

USE OF QUERCETIN IN EQUINE SEMEN COOLING MEDIUM BASED ON SKIMMED MILK POWDER

K. R. S. GABIATO¹, A. R. G. ALMEIDA², L. S. SILVA³, R. G. MOTTA⁴, K. A. STRAIOTO⁵,
L. H. FERRARIN⁶, L. S. A. MARTINS⁷, A. C. MARTINEZ⁸

RESUMO

A biotécnica de refrigeração de sêmen equino para o transporte de material genético está amplamente distribuída. Com a necessidade da manutenção da viabilidade espermática é indispensável a utilização e diluentes para este fim. O objetivo deste estudo foi avaliar se a adição de quercetina, que é um flavonóide antioxidante, em diluentes espermáticos altera a viabilidade dos espermatozoides equinos refrigerados. Foram avaliados cinco ejaculados de um garanhão, por meio da análise de motilidade e vigor espermático, em diferentes períodos de refrigeração em quatro meios de diluição: BotuSêmen[®]; BotuSêmen[®] adicionado de 20 µg/mL de quercetina (SIGMA[®]); Solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico[®]) ou Solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico[®]) adicionado de 20 µg/mL de quercetina (SIGMA[®]). Por meio dos resultados obtidos no presente estudo, foi possível verificar que não há diferença estatística entre a motilidade espermática de sêmen de garanhão diluído em BotuSêmen[®] em relação ao diluído solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico[®]) pelo período de refrigeração avaliado (36h).

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidante. Motilidade. Diluente. Garanhão.

SUMMARY

The biotechnology of equine semen cooling for the transfer of genetic material is widely distributed. With the need to maintain sperm viability, it is indispensable to use and thinners for this purpose. The aim of this study was to evaluate whether the addition of quercetin, which is an anti-oxidant flavonoid, in spermatic diluents alters the viability of refrigerated equine spermatozoa. Five ejaculates of a stallion were evaluated by analysis of motility and spermatic vigor in different cooling periods in four dilution media: BotuSêmen[®]; BotuSêmen[®] added 20 µg/mL of quercetin (SIGMA[®]); Aqueous solution with 10% skimmed milk powder (Molico[®]) or Aqueous solution with 10% skimmed milk powder (Molico[®]) added 20 µg/mL quercetin (SIGMA[®]). Through the data obtained, it was possible to verify that there is no statistical difference between the sperm motility of diluted stallion semen in BotuSêmen[®] in relation to the diluted aqueous solution with 10% skimmed milk powder (Molico[®]) for the evaluated refrigeration period (36h).

KEY-WORDS: Antioxidant. Motility. Diluent. Stallion.

¹ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Medicina Veterinária, Campus Regional de Umuarama, Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, Umuarama, PR, Brasil.

² Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Medicina Veterinária, Campus Regional de Umuarama, Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, Umuarama, PR, Brasil.

³ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Medicina Veterinária, Campus Regional de Umuarama, Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, Umuarama, PR, Brasil.

⁴ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Medicina Veterinária, Campus Regional de Umuarama, Umuarama, PR, Brasil. E-mail: rgmotta2@uem.br

⁵ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Medicina Veterinária, Campus Regional de Umuarama, Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, Umuarama, PR, Brasil

⁶ Médico Veterinário, Haras FS, Umuarama, PR, Brasil.

⁷ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Botucatu, SP, Brasil.

⁸ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Medicina Veterinária, Campus Regional de Umuarama, Programa de Pós-Graduação em Produção Sustentável e Saúde Animal, Umuarama, PR, Brasil

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial torna possível a utilização de um macho para fertilização de várias fêmeas, permite o transporte da genética sem necessidade de movimentar animais, assim como, limita a transmissão de algumas doenças e reduz a incidência de traumas durante a monta natural (Prien, 2016). Entretanto, alguns desafios ainda persistem nas tecnologias de reprodução equina, como é o caso da criopreservação de espermatozoides.

A criopreservação do sêmen de garanhões é uma importante biotécnica da reprodução animal assistida, entretanto, durante o processo de refrigeração, os espermatozoides, são submetidos a choque térmico com elevado estresse oxidativo, que provocam danos à membrana celular espermática com lesões irreversíveis ao material genético, que implicam diretamente na redução da fertilidade do ejaculado (Pagl, 2006).

O uso do sêmen refrigerado tem sido prioritário nas inseminações artificiais de éguas, é utilizado em maior proporção, frente ao sêmen congelado, com resultados promissores, que se assemelham, muitas vezes à monta natural. Entretanto, com a vantagem de servir maior número de éguas por garanhão e ainda, possibilitar incremento genético e melhores condições sanitárias para os haras, visto que, limita o transporte dos animais e o contato dos garanhões com éguas de diferentes origens (Meirelles et al., 1998; Maciel, 2016).

A redução da temperatura durante o processo de resfriamento do sêmen e a sua exposição ao ar atmosférico, proporcionam a diminuição do catabolismo espermático, dessa forma, o estresse térmico sobre a célula espermática, aumenta a peroxidação lipídica no local, por consequência, ocorrerá maior síntese e disponibilização das espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam danos físicos, químicos estruturais aos espermatozoides (Filho et al., 2017).

Os EROs, quando em concentrações exageradas, desencadeiam uma importante sequência de efeitos deletéricos sobre as células espermáticas, pois podem interferir no metabolismo de múltiplas enzimas, lipopolissacarídeos de membrana, proteínas, açúcares e até mesmo, sobre o material genético, com impactos diretos sobre a viabilidade dos espermatozoides criopreservados (Sicherle, et al., 2020).

Entretanto, o estresse térmico ocasionado pelo processo de congelamento do sêmen é mais severo, quando comparado a refrigeração, assim, os danos estruturais às células espermáticas, podem comprometer suas funções vitais, prejudicando a motilidade e a capacidade de fecundação dos espermatozoides (Nunes et al., 2006). Em síntese, a ação das EROs e a peroxidação lipídica prejudicam a qualidade do sêmen submetidos aos processos de criopreservação. (Monteiro, 2015).

Na espécie equina, há uma suscetibilidade maior a peroxidação lipídica por possuir elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados na membrana celular dos espermatozoides (Pagl, 2006). Dessa forma, os lipídios podem ser desestabilizados pelos radicais livres que são produzidos pelos espermatozoides durante o metabolismo aeróbico (Nunes et al., 2006; Lançon, 2015).

Considerando que a refrigeração do sêmen

provoca redução significativa da motilidade espermática, o uso de diluentes se torna indispensável para manutenção das propriedades do sêmen (Pagl, 2006). Dentre os diluentes mais utilizados destacam-se a gema de ovo e o leite desnatado. Este último é rico em lipoproteínas, sendo capaz de estabilizar elementos proteicos da membrana celular dos espermatozoides por períodos suficientes para transportes de curta duração, além de ser de baixo custo e fácil acesso (Meirelles et al., 1998; Castro et al., 2014; Oliveira et al., 2014).

Os antioxidantes são utilizados para proteger os espermatozoides de possíveis lesões provocadas pelo estresse oxidativo que ocorrem durante todas as etapas da criopreservação, tanto no processo de refrigeração, congelamento e descongelamento, estes podem ser divididos em dois tipos: enzimáticos e não enzimáticos (Sicherle, et al., 2020).

Os antioxidantes, de origem endógena e ação enzimática, podem ser exemplificados pela: catalase, a produção de superóxido dismutase e a síntese da cisteína. Em contrapartida, os antioxidantes não enzimáticos, como: a vitamina C, vitamina E e o resveratrol, que se tornaram o alvo de recentes estudos, como aditivos em meios de criopreservação de sêmen em diferentes espécies de animais, com foco na proposta de reduzir os danos causados pelos EROs sobre as células espermáticas (Savi, 2015; Sicherle, et al., 2020).

A quercetina trata-se de um flavonóide que atua como antioxidante não enzimático capaz de inibir a formação de radicais livres pela interação com íons superóxidos, através da reação com radicais peroxilipídicos e por quelação de íons ferro (Silva et al., 2018). Pode ser encontrada em frutas, sementes, grãos, folhas (couve, cebola vermelha, caules e raízes). Também é utilizada como ingrediente em suplementos alimentares e bebidas funcionais (Restrepo, 2016). Quando adicionada ao diluidor do sêmen pode melhorar a motilidade dos espermatozoides, além de reduzir a fragmentação do DNA em amostras de sêmen sexado (Restrepo, 2016, Silva et al., 2018).

A busca por diluentes de sêmen para a espécie equina é uma necessidade, dado ao aumento da aplicabilidade destas biotecnologias da reprodução animal, assim, o desenvolvimento de produtos inovadores para esse segmento, deve ser uma busca contínua e foco de outras pesquisas, uma das propostas deste estudo, foi trazer o uso de insumos alternativos, que possibilitem resultados equivalentes e/ou superiores, aos produtos disponibilizados comercialmente país.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a adição de quercetina (flavonóide anti-oxidante) em diluentes espermáticos altera a viabilidade dos espermatozoides refrigerados de um garanhão.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado no CEUA nº 8108180919 (ID 002371), posto que o experimento em questão, está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como, com as normas editadas pelo

Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

O estudo foi conduzido no município de Umuarama, no noroeste do Paraná, utilizando-se cinco ejaculados de um garanhão comprovadamente fértil da raça Quarto de Milha, no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM – campus Umuarama).

Os ejaculados foram colhidos com vagina artificial, com auxílio de uma égua em estro como manequim. As colheitas foram realizadas em um período de 30 dias, com intervalos de 6 dias. Os parâmetros avaliados foram motilidade e vigor espermáticos, em microscópio Nikon Eclipse 200, seguindo critérios estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Após a determinação da motilidade e do vigor espermático no tempo zero, o sêmen foi centrifugado a 600 G por 10 minutos e o pellet foi ressuspensionado e diluído em um destes quatro meios: BotuSêmen® ou Grupo 1; BotuSêmen® adicionado de 20 µg/mL de quercetina (SIGMA®) ou Grupo 2; Solução aquosa com

10% leite em pó desnatado (Molico®) ou Grupo 3 ou Solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico®) adicionado de 20 µg/mL de quercetina (SIGMA®) ou Grupo 4, constituindo os 4 tratamentos, que foram realizados de maneira simultânea para todos os ejaculados, em 5 momentos ao longo do estudo.

Para a determinação dos resultados relativos a cada grupo de estudo, realizou-se o processamento em triplicata, assim o resultado final de cada grupo de estudo foi obtido através das médias provenientes da análise de 3 tubos, conferindo um modelo experimental 4X5, conforme a Figura 1.

Nos tubos cônicos de 3 mL foram colocados 1 mL de cada meio, sendo utilizados 15 tubos em cada tratamento. Em cada tubo foi adicionado 50×10^6 espermatozoides. Os tubos foram distribuídos em cinco caixas isotérmicas comerciais (BotuFlex®), pré resfriadas por duas horas com gelo reciclável. Cada caixa recebeu três tubos de cada grupo de diluente, totalizando 12 tubos por caixa, como representado na figura 1.

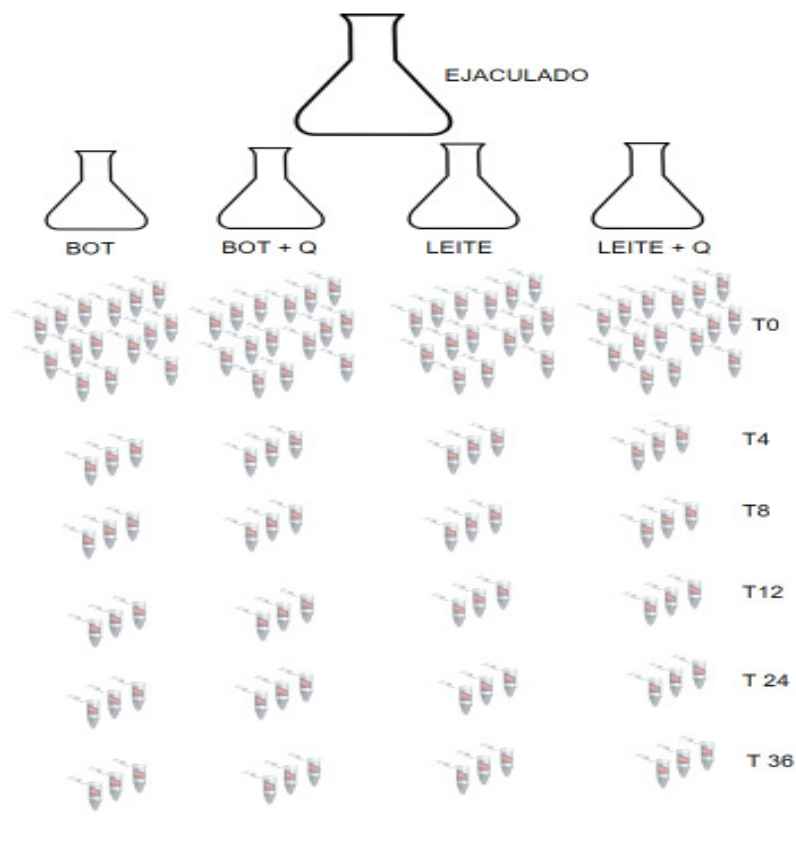


Figura 1 - Esquema representativo da distribuição dos meios avaliados: BotuSêmen (BOT); BotuSêmen + quercetina (BOT+Q); Leite desnatado (LEITE); Leite desnatado + quercetina (LEITE+Q); para diferentes momentos de avaliação: quatro horas após a colheita (T4), oito horas após a colheita (T8), 12 horas após a colheita (T12), 24 horas após a colheita (T24) e 36 horas após a colheita (T36).

As avaliações foram realizadas após quatro, oito, 12, 24 e 36 horas, considerando o horário inicial o momento que os tubos eram dispostos nas caixas. De acordo com os momentos de avaliação, uma caixa era aberta e avaliada, analisando-se motilidade e vigor em microscópio óptico, sempre pelo mesmo avaliador. Antes

da avaliação os tubos eram aquecidos em banho-maria a 36 °C por 2 minutos. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste Tukey, considerando 5% ($p < 0,05$), como nível de significância com auxílio do programa SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A motilidade total, expressa em porcentagem, não apresentou diferença significativa nos diferentes meios avaliados até 12h pós início da refrigeração: BotuSêmen[®] (61,33% ±8,33), Leite + quercetina (56,67% ±10,46), Leite (58,67% ±12,45), BotuSêmen[®] + quercetina (62,00% ±12,64), conforme a Tabela 1.

Estes resultados foram compatíveis com os estudos de Meirelles et al., (1998) que verificaram boa manutenção dos valores de motilidade de sêmen equino resfriado em meio a base de leite desnatado UHT. Dessa forma, observou-se a possibilidade da utilização de leite como meio de refrigeração para sêmen de garanhão sem perdas na viabilidade seminal até 12h de refrigeração, reduzindo o custo desta biotécnica, além da facilidade no acesso do produto.

Por questões operacionais e disponibilidade de recursos, somente foi possível a coleta de sêmen de um único garanhão, condição esta caracterizada como principal limitação do presente estudo, por isso, as análises foram realizadas em triplica e em vários momentos após a coleta.

Silva (2018) ao acrescentar 20 µg de quercetina em BotuSêmen[®] durante a refrigeração do sêmen equino por 24 horas não verificou influência nos parâmetros de cinética espermática, assim como os dados obtidos no presente estudo, que também não observou diferença estatística entre a motilidade avaliada com 24h de refrigeração entre o sêmen diluído em BotuSêmen[®] (59,33 ±12,79) e o diluído em BotuSêmen[®] acrescido de 20 µg de quercetina (56,00 ±11,21).

Embora a concentração de quercetina a ser utilizada não esteja completamente definida, a adição de 20 µg/mL padronizada neste estudo, para o diluente a base de leite desnatado 10% (Molico[®]), apresentou resultados de motilidade com 24h de refrigeração semelhantes, do ponto de vista estatístico, ao sêmen resfriado em meio comercial BotuSêmen[®].

No presente trabalho não se observou diferença estatística para os valores de motilidade durante o período de refrigeração avaliado (36h) entre sêmen diluído em BotuSêmen[®], BotuSêmen[®] acrescido de 20 µg de quercetina e em leite desnatado 10% (Molico[®]) acrescido de 20 µg de quercetina como descrito na Tabela 1, indicando a possibilidade do uso de leite desnatado 10% (Molico[®]) acrescido de 20 µg de quercetina em substituição ao diluente comercial testado BotuSêmen[®], acrescido ou não de 20 µg de quercetina, mantendo a mesma viabilidade espermática. Além disso foi possível verificar que com 36h de refrigeração houve resultados de motilidade maiores no meio de diluição a base de leite desnatado 10% (Molico[®]) acrescido de 20 µg de quercetina (50,00 ±11,33) em relação ao diluído em meio comercial BotuSêmen[®] (47,33 ±10,33).

Castro (2014), conduziu um estudo semelhante, em que não obteve diferença estatística para os valores de motilidade entre ejaculados de garanhões, submetidos a diluição com meio comercial (BotuSêmen[®]) em comparação ao diluente composto por leite desnatado em até 24h de refrigeração. Enquanto, o presente experimento demonstrou resultados discordantes, pois com o mesmo intervalo de tempo, a motilidade apresentou-se menor

para o sêmen diluído, exclusivamente, com leite desnatado 10% (Molico[®]), quando comparado aos demais grupos de estudo, reiterando que após 12h de refrigeração, o diluente constituído apenas por leite desnatado não é tão eficaz na manutenção da viabilidade espermática de garanhões.

É oportuno enaltecer, que o sêmen diluído com o meio comercial BotuSêmen[®] não diferiu dos resultados obtidos para a diluição em leite desnatado 10% (Molico[®]) acrescido de 20 µg de quercetina e BotuSêmen[®] acrescido de quercetina. Esse resultado sinaliza para a importância do uso de antioxidantes, em meios de diluição de sêmen equino, em conformidade com os trabalhos conduzidos por Filho et al., 2017 e Silva et al., 2018.

No processo de criopreservação dos espermatozoides de diversas espécies de animais, é comum o uso de diluidores de sêmen à base de leite desnatado ou integral, como descrito por Pagl (2006), a caseína é uma fosfoproteína, presente no leite, que desempenha papel fundamental na proteção dos espermatozoides contra o choque térmico, como demonstrado por Appiah et al., (2020). Portanto, as micelas de caseína isoladas do leite podem proteger sêmen durante o armazenamento entre 4-5°C. Além disso, as micelas de caseína também podem proteger o sêmen durante o congelamento na presença de glicerol (Pagl, 2006).

Segundo Sicherle et al. (2020) a condição oxidativa provocada pela criopreservação induz alterações nas atividades enzimáticas e na fluidez da membrana, que resulta em redução da motilidade, viabilidade e capacidade de fertilização dos espermatozoides.

O estudo conduzido por Silva et al., (2018) também concluiu que a quercetina em altas concentrações, quando acrescida aos diluidores de sêmen na espécie caprina, limita as oscilações deletérias dos espermatozoides pode ser favorável à fertilidade também em outras espécies.

Silva et al., (2018) reiteraram que a adição da quercetina antioxidante ao diluente de sêmen de garanhões é uma ferramenta importante para reduzir os danos sofridos pelos espermatozoides durante a criopreservação, resultando em melhores taxas de gestação nas éguas inseminadas com o sêmen congelado, especialmente para garanhões cujos ejaculados são sensíveis ao processo de congelamento.

Porém, em outro experimento conduzido por Filho et al., (2017) a adição exclusiva de quercetina no diluidor do sêmen de garanhões, em quatro concentrações diferentes (0,25, 0,5, 0,75 ou 1 mM) não afetou a motilidade progressiva, a funcionalidade mitocondrial, a reação do acrossoma, a integridade da membrana ou o índice de fragmentação do DNA no sêmen congelado.

No presente estudo, foi possível observar que um mesmo diluente (solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico[®]) quando acrescido de um antioxidante - 20 µg/mL de quercetina (SIGMA[®])-, apresentou resultados numericamente superiores de motilidade como descrito na Tabela 1. Esses resultados sugerem que o uso de anti-oxidantes como a quercetina, em diluidores de sêmen para a espécie equina, reduzem a ação dos EROs e propiciam melhor ambiente para a manutenção espermática, desde que, o material se mantenha sob condições de refrigeração.

Tabela 1 - Valores médios de motilidade espermática, em porcentagem, de sêmen de um garanhão da raça Quarto de Milha, avaliados imediatamente após a colheita (T0), quatro horas após a colheita (T4), oito horas após a colheita (T8), 12 horas após a colheita (T12), 24 horas após a colheita (T24) e 36 horas após a colheita (T36), refrigerado em diferentes diluentes.

Tratamento	Tempos					
	T0	T4	T8	T12	T24	T36
BOT	58,00 ^a ±7,74	63,33 ^a ±8,99	60,00 ^a ±9,25	61,33 ^a ±8,33	59,33 ^a ±12,79	47,33 ^a ±10,33
BOT+Q	58,0 ^a ±7,74	63,33 ^a ±10,46	62,86 ^a ±10,69	62,00 ^a ±12,64	56,00 ^a ±11,21	50,67 ^a ±10,99
LEITE	58,0 ^a ±7,74	58,67 ^a ±9,15	56,00 ^a ±10,55	58,67 ^a ±12,45	46,43 ^b ±14,99	44,67 ^a ±9,90
LEITE+Q	58,0 ^a ±7,74	61,33 ^a ±9,90	56,67 ^a ±14,47	56,67 ^a ±10,46	57,33 ^a ±11,62	50,00 ^a ±11,33

Síglas: BOT: BotuSêmen; BOT+Q: BotuSêmen + quercetina; LEITE: Leite desnatado; LEITE+Q: Leite desnatado + quercetina.

Souza et al., (2016) também concluíram que a adição de melatonina, antioxidante terminal, no sêmen diluído pode ser útil para melhorar o processo de criopreservação do sêmen na espécie ovinos, e impacta em maiores taxas de fertilização nos programas de inseminação artificial em ovelhas.

Esses resultados ressaltam que a inclusão de antioxidantes, independente da origem lipossolúvel ou hidrossolúvel, aumentam a taxa de sobrevivência dos espermatozoides submetidos ao dano oxidativo do descongelamento. Ainda, é possível que os antioxidantes também neutralizem os radicais livres que promovem a peroxidação lipídica na membrana celular dos espermatozóides. (MCNIVEN MA, RICHARDSON).

Os valores médios de vigor espermático, apesar de não apresentar diferença estatística, obtiveram resultados numericamente maiores quando avaliados no meio de diluição comercial como descrito na Tabela 2. Este dado pode estar relacionado a composição química dos meios utilizados, caracterizando-se o meio comercial como um diluente com maior fornecimento de energia aos espermatozoides.

Desse modo, o presente estudo trouxe resultados promissores para o desenvolvimento de um diluente de sêmen de garanhões com a adição da quercetina em meio base de refrigeração de sêmen a base de leite em pó desnatado, o que possibilitaria o barateamento e facilidade de acesso ao diluente.

Tabela 2 - Valores médios de vigor espermático de sêmen de um garanhão da raça Quarto de Milha, avaliados imediatamente após a colheita (T0), quatro horas após a colheita (T4), oito horas após a colheita (T8), 12 horas após a colheita (T12), 24 horas após a colheita (T24) e 36 horas após a colheita (T36), refrigerado em diferentes diluentes.

Meio	Tempos					
	T0	T4	T8	T12	T24	T36
BOT	3,40 ^a ±0,50	3,13 ^a ±0,83	3,07 ^a ±0,70	2,87 ^a ±0,74	2,53 ^a ±0,63	2,27 ^a ±0,45
BOT+Q	3,40 ^a ±0,50	3,27 ^a ±0,79	3,07 ^a ±0,73	2,93 ^a ±0,59	2,67 ^a ±0,48	2,47 ^a ±0,51
LEITE	3,40 ^a ±0,50	2,87 ^a ±0,63	2,67 ^a ±0,81	2,40 ^a ±0,63	2,14 ^a ±0,86	1,93 ^a ±0,59
LEITE+Q	3,40 ^a ±0,50	3,07 ^a ±1,03	2,67 ^a ±0,89	2,40 ^a ±0,63	2,27 ^a ±0,70	2,00 ^a ±0,65

Síglas: BOT: BotuSêmen; BOT+Q: BotuSêmen + quercetina; LEITE: Leite desnatado; LEITE+Q: Leite desnatado + quercetina.

CONCLUSÃO

A adição de quercetina 20 µg/mL (SIGMA[®]) em meio de diluição seminal a base de solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico[®]), faz com que este produto obtenha resultados semelhantes ao meio de diluição comercial testado (BotuSêmen[®]), em até 36h de refrigeração, acrescido ou não de quercetina, evidenciando que a adição deste flavonóide auxilia na manutenção da viabilidade espermática em meio de diluição seminal a base de solução aquosa com 10% leite em pó desnatado (Molico[®]).

REFERÊNCIAS

APPIAH, M.O.; LI, W.; ZHAO, J.; LIU, H.; DONG, Y.; XIANG, J.; WANG, J.; LU, W. Quercetin

supplemented casein-based extender improves the post-thaw quality of rooster semen. **Cryobiology**, v. 31, n. 2, p. 252, 2020.

CASTRO, F.S. **Comparação entre diferentes tipos de leites como diluentes para sêmen equino refrigerado**. 2014. 36 p. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias – Reprodução animal).

CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte, 2013. 104 p.

FILHO, J.S.; CORCINI, C.D.; SANTOS, F.C.C.; ANCIUTI, A. N.; GATTI, N. L. S.; ANASTACIO, E.; MIELKE, R.; CEW, N.; CURCIO, B. R.; VARELA-

- JUNIOR, A. S. Quercetin in equine frozen semen. **Cryo Letters**, v. 38, n. 4, p. 299-304, 2017.
- LANÇONI, R.; CELEGHINI, E.C.C.; BIANCHINI-ALVES, M.R.; SANTOS, G.C.; FLOREZ-RODRIGUES, S.A.; LEITE, T.G.; ARRUDA, R.P. Use of melatonin and ferulic acid as promoters of cryopreserved equine sperm. **Animal Reproduction**, v.12, n.3, p.559, Jul./Sept. 2015.
- MACIEL, A.C.; CAMARGO, V.; MATTOS, R.C.; RECHSTEINER, S. F. Viabilidade do sêmen equino armazenado em sistema de polietileno para transporte por oito horas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p.1429, 2016.
- McNIVEN, M.A.; RICHARDSON, G.F. Efeito da quercetina no estado de capacitação e peroxidação lipídica de espermatozoides de garanhão. **Cell Preservation Technologies** v. 4, p. 169-177, 2006.
- MEIRELLES, L.S.; MALSCHITSKY, E.; PIRES NEVES, A.; VIEIRA, M.J.; KELLER, A.; HÖTT, A.K.; MORAES, I.M.A.; GARBADE, P.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R. G. Leite em pó desnatado não inativado e leite desnatado uht para preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado, **Ciência Rural**, v.28, n 3, p. 467-470, 1998.
- MONTEIRO, J.A.B. **Efeito da suplementação oral do óleo de arroz na congelabilidade do sêmen ovino**. 2015. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- NUNES, D.B.; ZUCCART, C.E.S.N.; SILVA, E.V.C. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.1, p.42-56, 2006.
- OLIVEIRA, R.R.; RATES, D.M.; PUGLIESI, G.; KER, P.G.; ARRUDA, R.P.; MORAES, E.A.; CARVALHO, G.R. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin in donkey semen cryopreservation improves sperm viability but results in low fertility in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 845-850, 2014.
- PAGL, R. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. **Theriogenology**, v. 66, n.5. p. 1115-1122, 2006
- PAGL, R.; AURICH, C.; KANNOFER, M. Antioxidative status and semen quality during cooled storage in stallions. **Journal of veterinary medicine**, v. 53, n.9. p. 486-489, 2006.
- PRIEN, S.; IACOVIDES, S. Cryoprotectants & Cryopreservation of Equine Semen: A Review of Industry Cryoprotectants and the Effects of Cryopreservation on Equine Semen Membranes. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**. v.3, n 1, p. 2-8, 2016.
- RESTREPO, G.; MONTOYA, J.D.; ROJANO, B. Capacidad antioxidante y calidad post-descongelación del semen equino criopreservado con quercetina y ergotioneina. **Revista de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. v.63, n.3, 2016.
- SAVI, P.A.; ZAVAREZ, P.; KIPPER, L.B.; FELICIANO, B.H.; VICENTE, M.A.R.; OLIVEIRA, W.R.R. Uso de antioxidantes em meios diluidores para sêmen ovino: revisão de literatura. **ARS VETERINARIA**, v.31, n.1, p. 012-018, 2015.
- SICHERLE, C.C.; SOUZA, F.F.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; MOTHÉ, G.B.; PADOVANI, C.R.; PAPA, F.O.; LOPES, M. D. Effects of the cryopreservation process on dog sperm integrity. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 17, n. 1, e20190081, 2020.
- SILVA, L.F.M.C.; ARAUJO, E.A.B.; OLIVEIRA, S.N.; DALANEZI, F.M.; JUNIOR, L.R.P.A.; CARNEIRO, J.A.M.; RODRIGUESA, L.T.; HAYASHI, R.M.; CRESPILO, A.M.; DELL'AQUA, C.P.F.; DELL'AQUA, J.A. JUNIOR.; PAPAA, F. O. Quercetin promotes increase in the fertility rate of frozen semen of Stallions considered sensitive to freezing. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 82, 2018.
- SOUZA, W. L.; MORAES, E. A.; COSTA, J.M.S.; SOUSA, P. H.F.; LOPES JUNIOR, E. S.; OLIVEIRA, R. P; TONIOLLI, R. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.7 p. 657-664, 2016.
- SICHERLE, C.C.; SOUZA, F.F.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; MOTHÉ, G.B.; PADOVANI, C.R.; PAPA, F.O.; LOPES, M. D. Effects of the cryopreservation process on dog sperm integrity. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 17, n. 1, e20190081, 2020.
- SILVA, L.F.M.C.; ARAUJO, E.A.B.; OLIVEIRA, S.N.; DALANEZI, F.M.; JUNIOR, L.R.P.A.; CARNEIRO, J.A.M.; RODRIGUESA, L.T.; HAYASHI, R.M.; CRESPILO, A.M.; DELL'AQUA, C.P.F.; DELL'AQUA, J.A. JUNIOR.; PAPAA, F. O. Quercetin promotes increase in the fertility rate of frozen semen of Stallions considered sensitive to freezing. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 82, 2018.