



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CAMPUS II - AREIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

IARA NÓBREGA MACÊDO

ADIÇÃO DE GÁS OZÔNIO AO DILUENTE DE SÊMEN EQUINO
SUBMETIDO A CONGELAÇÃO: EFEITO SOBRE A VIABILIDADE DAS
CÉLULAS ESPERMÁTICAS

AREIA

2021

IARA NÓBREGA MACÊDO

**ADIÇÃO DE GÁS OZÔNIO AO DILUENTE DE SÊMEN EQUINO
SUBMETIDO A CONGELAÇÃO: EFEITO SOBRE A VIABILIDADE DAS
CÉLULAS ESPERMÁTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Sildivane Valcácia Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

AREIA

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M141a Macêdo, Iara Nóbrega.

Adição de gás ozônio ao diluente de sêmen equino submetido a congelamento: efeito sobre a viabilidade das células espermáticas / Iara Nóbrega Macêdo. -
Areia:UFPB/CCA, 2021.

89 f. : il.

Orientação: Sildivane Valcácia Silva.

Coorientação: Gustavo Ferrer Carneiro.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Ciência Animal. 2. Antioxidantes. 3. Criopreservação. 4. Ozonioterapia. 5. Espermatozóide. 6. Sêmen equino. I. Silva, Sildivane Valcácia. II. Carneiro, Gustavo Ferrer. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09(043.3)



IARA NOBREGA MACÊDO

**ADIÇÃO DE GÁS OZÔNIO AO DILUENTE DE SÊMEN EQUINO SUBMETIDO
A CONGELAÇÃO: EFEITO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS
ESPERMÁTICAS.**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
Concentração Saúde Animal no Brejo
Paraibano.

APROVADA EM 04/08/2021

BANCA EXAMINADORA

Dra. SILDIVANE VALCÁCIA SILVA
UFPB
Orientadora

Dra. FERNANDA SAULES IGNÁCIO
FACULDADE EDUVALE DE AVARÉ
Examinadora

Dr. HELDER MELO DE SOUZA
UFRPE
Examinador

*A Deus que me deu o dom da vida,
seu fôlego de vida em mim tem me sustentado até aqui.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Em tempos difíceis de pandemia nos quais estamos vivendo, ser grato tem tornado tudo mais leve. Sendo assim, meu primeiro agradecimento é a Deus.

Agradeço pela vida, pela saúde, pela sua proteção, por me permitir ter os meus comigo e por estar encerrando mais um ciclo, com erros e acertos, lágrimas e sorrisos, mas acima de tudo, com muito aprendizado até aqui.

Aos meus pais José Macêdo e Maria do Socorro, que me ensinaram o caminho da retidão, da humildade e me são incentivos diários para não desistir. A vocês, minha eterna gratidão por tudo que me tornei.

Ao meu esposo Gabriel Petelinkar, que é o melhor parceiro que eu poderia ter, foi um encontro de almas, ele que divide a vida comigo, as dificuldades, as vitórias e os sonhos. Obrigada por tudo que a gente vem construindo e por ter sido meu grande alicerce nessa caminhada.

A minha irmã Isis Larissa, que tem permanecido ao meu lado e que é minha inspiração e meu amor, até antes mesmo de eu conseguir compreender esse sentimento. A presença dela é sempre como abrir um álbum de fotos antigas, ela consegue trazer lembranças da minha essência nas quais me permitem permanecer.

A minha avó Maria do Carmo (*in memoriam*) e a Rita Limeira, que me conduziram na fé e me trouxeram valores inenarráveis.

Aos meus sogros Luís Geraldo e Eudete Petelinkar, assim como a minha cunhada Giovana Petelinkar, pois apesar de estarem há km de distância, se fazem presentes em oração e me encorajam a seguir.

A Gabriela Amorim e Victor Garcia, minha base no mundo da reprodução equina, a eles minha eterna gratidão e admiração por terem me proporcionado grandes ensinamentos e por serem amigos que eu levo para a vida.

Aos meus amigos Máisa Alves, Lívia Matos, Daniel Andrade, Carol Galante, Brenda Carvalho e tantos outros que compreenderam minha ausência e foram cruciais para tornar essa caminhada mais leve. Ao lado deles vale a pena celebrar as conquistas da vida.

A Central Monte Verde pelo acolhimento para realização do meu experimento, em especial a Breno Santana e Diogo Gutemberg, sem os quais seria impossível a realização dessa pesquisa. Obrigada pelo companheirismo, pelas risadas, pelo cuidado e pelo empenho que vocês tiveram.

Ao Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal da Universidade Federal da Paraíba (LABRA - UFPB) por todo conhecimento compartilhado durante dois anos, todos os debates enriquecedores e todas as sessões de terapia em nossas sabatinas, vocês se tornaram minha família durante esse processo, não seria justo citar nomes quando todos fizeram a caminhada valer a pena, mas externo meus agradecimentos a Mariana, Wilias, Christianne e Camilla que de maneira indireta contribuíram para a finalização deste trabalho.

Ao Laboratório de Andrologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (ANDROLAB - UFRPE), por ceder suas instalações para realização das análises, em especial a Lúcia Arruda e Thalles Maciel, que dividiram comigo momentos de muito trabalho, mas também de muita diversão e leveza. Se dispuseram a me ajudar abdicando de suas atividades e vencemos até o COVID juntos.

A minha orientadora Sildivane Valcácia, por ter acreditado em mim há alguns anos atrás e hoje estarmos trilhando essa caminhada juntas, ela é a extensão do cuidado que minha mãe tem comigo, ela consegue ser colo, aconchego, carinho de mãe, puxão de orelha, inspiração e uma inesgotável fonte de conhecimentos que levo para a vida. Palavras não seriam suficientes para expressar minha gratidão.

Ao meu co-orientador Gustavo Ferrer, ele que sempre me estendeu a mão, acreditou nas minhas ideias e abriu as portas da Central para que fosse realizada essa pesquisa, sem ele, nada disso teria sido possível. Ele é um exemplo de profissional e amigo, tenho orgulho de tê-lo como uma inspiração.

A UFPB, a CAPES e a FAPESQ pelo apoio educacional e financeiro. Também aos animais que são o sentido de tudo, a razão pela qual estou aqui, em especial aos que estiveram nesse experimento e contribuirão de forma enriquecedora para a ciência.

A todos, o meu muito obrigado!

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações de ozônio ao sêmen de garanhões da raça quarto de milha submetidos à criopreservação. Foram colhidos seis ejaculados de quatro garanhões (n=24). Os ejaculados foram divididos e adicionados a quatro grupos experimentais: grupo controle composto apenas pelo diluidor de congelamento (BotuCRIO®) e outros três grupos com diluidor de congelamento (BotuCRIO®) ozonizado nas concentrações de 6, 8 e 12 µg de O₃/mL. As amostras de sêmen foram diluídas (200 x 10⁶ espermatozoides/mL), envasadas em palhetas de 0,5 mL e submetidas à congelamento. Após a descongelamento (37 °C, 30s), as amostras foram avaliadas nos momentos 0, 30 e 60 minutos de incubação quanto a cinética espermática, integridade da membrana plasmática (IMP), integridade de acrossoma (iAC) e potencial de membrana mitocondrial (PMM). Os parâmetros cinéticos foram avaliados por meio do sistema computadorizado de análise espermática (CASA), e os testes de integridade celular foram realizados em microscopia de epifluorescência através do uso de sondas fluorescentes. Houve redução nos parâmetros cinéticos (MT, MP, VCL, VSL e VAP) em todos os grupos durante o teste de termorresistência (TTR), padrão também encontrado nas análises de IMP e PMM (p<0,05). Para os parâmetros cinéticos de MT, LIN, STR, WOB, ALH e BCF não houve diferença (p>0,05) entre o grupo controle e os tratamentos (6, 8 e 12 µg de O₃/mL), em nenhum dos tempos avaliados. Em relação aos parâmetros VCL, VSL e VAP, o grupo tratado com 6 µg não diferiu do controle nem do 8 µg, porém foi superior ao 12 µg nos tempos 30 e 60 minutos. iAC e IMP não apresentaram diferença entre os grupos (p>0,05) e PMM foi inferior nos grupos 8 µg e 12 µg comparado ao controle e ao 6 µg (p<0,05). Conclui-se que a adição do ozônio não apresenta efeitos benéficos para a criopreservação do sêmen equino nas concentrações utilizadas e diminui parâmetros importantes para a fertilidade.

Palavras-chave: antioxidantes; criopreservação; ozonioterapia; espermatozoide; sêmen equino.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of the addition of different concentrations of ozone to the semen of quarter horse submitted to cryopreservation. Six ejaculates from four stallions (n=24) were collected. The ejaculates were divided and added to four experimental groups: control group composed only of the freezing extender (BotuCRIO®) and three other groups with freezing extender (BotuCRIO®) ozonized at concentrations of 6, 8 and 12 µg of O₃/mL. The semen samples were diluted (200 x 10⁶ spermatozoa/mL), filled in reeds and frozen. After defrosting (37 °C, 30s), the samples were evaluated at moments 0, 30 and 60 minutes of incubated regarding spermatoc kinetics, plasma membrane integrity (PMI), acrossome integrity (ACi) and mitochondrial membrane potential (MMP). Kinetic parameters were evaluated using the computerized system of spermatoc analysis (CASA), and cellular integrity tests were performed under epifluorescence microscopy through the use of fluorescent probes. There was is reduction in kinetic parameters (TM, PM, VCL, VSL and VAP) in all groups during the thermoresistance test (TT), a pattern also found in PMI and MMP analyses (p<0.05). For the kinetic parameters of TM, LIN, STR, WOB, ALH and BCF there was no difference (p>0.05) between the control group and the treatments (6, 8 and 12 µg of O₃/mL), in any of the evaluated times. Regarding the Parameters VCL, VSL and VAP, the group treated with 6 µg did not differ from the control or from 8 µg, but was higher than 12 µg at 30 and 60 minutes. ACi and PMI showed no difference between groups (p>0.05) and PMI was lower in groups 8 µg and 12 µg compared to control and 6 µg (p<0.05). It is concluded that the addition of ozone does not present beneficial effects for cryopreservation of equine semen at the concentrations used and decreases important parameters for fertility.

Keywords: antioxidants; cryopreservation; ozone therapy; spermatozoa; stallion sperm.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Parâmetros cinéticos (média $\pm$ desvio padrão) de sêmen equino criopreservado com meio de congelação BotuCRIO® (GC = controle) e BotuCRIO® acrescido de ozônio (6, 8 e 12 μg de O_3/mL), avaliados nos momentos 0, 30 e 60 minutos pós-descongelação	48
Tabela 2	Integridades de membrana plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial (média $\pm$ desvio padrão) mensurados por microscopia de epifluorescência de sêmen equino criopreservado com meio de congelação BotuCRIO® (GC = controle) e BotuCRIO® acrescido de ozônio (6, 8 e 12 μg de O_3/mL), avaliados nos momentos 0, 30 e 60 minutos pós descongelação	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH - Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
ATP - Adenosina Trifosfato
BCF - Frequência do Batimento Flagelar
BHT - butil-hidroxitolueno
CASA - Sistema computadorizado de avaliação espermática
CAT - Catalase
DIC - Diacetato de Carboxifluoresceína
DMSO - Dimetilsulfóxido
ERO - Espécies reativas de oxigênio
FITC-PNA - Isotiocianato de Fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin*
GPx – Glutathione peroxidase
IA- Inseminação Artificial
iAC - Integridade de Acrossoma
iMP - Integridade de Membrana Plasmática
IP - Iodeto de Propídeo
JC-1 - Iodeto de 5,5',6,6' tetracoloro -1,1,3,3'- tetraetilbenzimidazolil
LIN - Linearidade
LPO - Lipoperoxidação
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MP - Motilidade Progressiva
MT - Motilidade Total
O - Oxigênio atômico
O₂ - Oxigênio
O₃ - Ozônio
PBS - Tampão fosfato salina
PMM – Potencial de Membrana Mitocondrial
SOD – Superóxido dismutase
SPTZ - Espermatozoides
STR – Retilinearidade
TRIS - Tris (Hidroximetil) Aminometano
UCD - Meio de Montagem
VAP - Velocidade Média do Percorso
VCL - Velocidade Curvilínea
VSL - Velocidade Linear
WOB - Índice de Oscilação

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

% - Porcentagem

min - Minuto

mg - Miligrama

µg - Micrograma

mL - Mililitro

L - Litro

Kg - Quilogramas

µL - Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	17
3.2	A CÉLULA ESPERMÁTICA	18
3.3	CONGELAÇÃO DE SÊMEN	19
3.4	EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO	20
3.4.1	Estresse oxidativo	21
3.4.2	Lipoperoxidação (LPO)	22
3.4.3	Diluidores e crioprotetores	22
3.4.4	Antioxidantes	23
3.4.5	Gás Ozônio (O₃)	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	ANIMAIS	27
4.2	COLHEITA E ANÁLISE DE SÊMEN	27

4.3	DILUIÇÃO E TRATAMENTOS	27
4.4	CONGELAÇÃO	28
4.5	DESCONGELAÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS	28
4.5.1	Cinética espermática	29
4.5.2	Testes de integridade celular	29
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5	RESULTADOS	32
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38
	APÊNDICE A – MANUSCRITO SUBMETIDO	50
	ANEXO A – RECOMENDAÇÕES DA REVISTA	74
	ANEXO B – CERTIFICADO CEUA	89

1 INTRODUÇÃO

A equideocultura tem ocupado uma posição de destaque no Brasil e tem sido responsável por movimentar a economia do país. Segundo dados do ANUALPEC, em 2019 o Brasil possuía um total de aproximadamente 5.501.872 equinos.

Com o impulso deste setor no agronegócio, fez-se necessário viabilizar técnicas que pudessem promover um melhoramento genético dos animais (BRANDÃO, 2008).

Uma das biotécnicas com maior impacto no mercado é a inseminação artificial (IA), uma ferramenta eficaz ao acelerar o ganho genético e viabilizar cruzamentos sem que as barreiras geográficas sejam consideradas uma limitação (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

A inseminação artificial associada a criopreservação de sêmen representa um importante recurso na preservação da espécie equina, tanto pela tentativa da maximização da fertilidade, quanto pelo uso de reprodutores superiores, formação de um banco genético disponível por tempo indeterminado para animais de alto padrão racial e comercial (YIMER *et al.*, 2016) e a possibilidade de um garanhão obter centenas de descendentes ao longo de sua vida reprodutiva (CANISSO *et al.*, 2008).

Apesar de inúmeros estudos serem constantemente desenvolvidos e demonstrarem grandes vantagens em seu uso, o sêmen congelado de garanhões ainda apresenta resultados de fertilidade variáveis (SANTOS *et al.*, 2015). Trabalhos apontam que um dos fatores importantes que ocorrem é que a criopreservação aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelos espermatozoides (LUCIO *et al.*, 2016) e diminui as defesas antioxidantes presentes no sêmen (MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2012).

Com o objetivo de reduzir danos oxidativos causados devido a ação de ERO, que podem influenciar na função espermática e no desequilíbrio entre produção e degradação (BANSAL; BILASPURI, 2011), pesquisadores têm adicionado substâncias antioxidantes aos diluidores de congelação com o intuito de melhorar a viabilidade espermática pós-descongelação (LI *et al.*, 2017).

O ozônio (O₃) é considerado um potente agente oxidante (INAL *et al.*, 2011), capaz de promover um estresse oxidativo, mas que em seguida induz uma resistência a esse estresse, ao estimular a resposta do sistema antioxidante (MANOTO *et al.*, 2018).

O ozônio é produzido por geradores medicinais, através da conexão com um cilindro de oxigênio, onde devido a um gradiente de alta-tensão, o oxigênio (O_2) é convertido em ozônio (O_3). É um gás com alta instabilidade e meia vida curta, ou seja, seu tempo de ação é de no máximo 40 min a 20 °C (SMITH *et al.*, 2017).

Confiável, barato, prático e com poucos efeitos adversos relatados, o O_3 tem se tornado uma boa alternativa altamente promissora, com vantagens importantes aos diversos tipos de pacientes (SEVERO, 2019), já que a nível sistêmico oferece uma série de benefícios com sua ação bactericida, anti-inflamatória e funções hemodinâmicas e analgésicas (DE ANDRADE *et al.*, 2019). Vem despertando interesse na medicina veterinária e sendo destaque no tratamento de várias patologias, devido ao seu poder de destruição oxidativa (GREENE *et al.*, 1993; HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ, 2001).

Várias substâncias antioxidantes já foram utilizadas no sêmen equino, porém, apesar de estar em largo desenvolvimento na medicina veterinária, principalmente na espécie equina, o O_3 ainda não possui estudos expressivos que comprovem sua segurança e eficácia quando trata-se de através de sua ação, estimular uma defesa antioxidante no sêmen de garanhões.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da adição do gás ozônio ao diluidor de criopreservação do sêmen de garanhões da raça quarto de milha.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a)** Adicionar ozônio ao diluidor comercial, previamente à ressuspensão do sêmen centrifugado;
- b)** Analisar as variáveis de cinética espermática de espermatozoides equinos congelados em diluidor acrescido de ozônio, de forma computadorizada;
- c)** Mensurar o efeito do diluidor ozonizado sobre a integridade de membrana plasmática do espermatozoide equino;
- d)** Verificar a atividade mitocondrial e integridade de acrossoma de espermatozoides equinos congelados com diluidor acrescido de ozônio.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A relação entre o cavalo e o homem por muito tempo foi apenas de serviço, sendo um meio de transporte e tração. Com o tempo, esses animais foram ganhando destaque em diversos esportes e sendo muito utilizados também no lazer. Devido a isso, é incontestável o crescimento mundial da equideocultura (MARIZ, 2008).

De acordo com dados do MAPA (2016), criadores de cavalos de vaquejada correspondiam a 9,3% dos criadores totais de cavalos no país no ano de 2014 e a comercialização de cavalos nesse ramo correspondia a 12,3% do comércio equestre total no Brasil. A vaquejada traz enraizada em sua história, a cultura nordestina, onde seu surgimento veio da missão de recolher o gado solto, quando não existiam cercas, com o auxílio de homens montados a cavalo (MAIA, 2003). Por ser genuinamente nordestino, esse esporte tem grande destaque na região Nordeste (FILHO, 2014).

Pinto (2019) realizou um estudo em algumas cidades do estado da Paraíba acerca desse mercado e percebeu que dentre os haras avaliados, a raça Quarto de Milha foi encontrada com um total de 76,47% e em segundo, ficou o Mangalarga marchador com 23,53%. Isso se justifica pelo fato de a vaquejada ser o esporte equestre mais praticado no estado da Paraíba e a raça quarto de milha ter uma maior aptidão para o esporte.

Com o avanço do mercado equino, fica evidente a relevância da reprodução equina, pois através da reprodução este mercado se desenvolve, sendo responsável pelo melhoramento genético e pelo número de produtos durante o ano (MACEDO, 2017).

Pode-se enfatizar algumas técnicas importantes para esse avanço no mercado do cavalo, como por exemplo, a criopreservação de sêmen, que teve grande aceitação no mundo dos criadores de praticamente todas as raças e a tendência é que aumente a quantidade e a qualidade desses animais (AFFONSO, 2013).

O crescimento do interesse comercial pela técnica da inseminação artificial utilizando sêmen congelado, incentivou que pesquisas na área de criopreservação de sêmen equino estivessem em constante desenvolvimento (ZIMMERMANN *et al.*, 2009).

3.2 A CÉLULA ESPERMÁTICA

Os espermatozoides consistem de duas estruturas principais, a cabeça e o flagelo. Na cabeça está localizado o acrossoma e em menor quantidade, o núcleo, além de citoplasma e estruturas citoesqueléticas (EDDY, 2006). O acrossoma é essencial na interação espermatozoide-oócito e o flagelo, está relacionado com a motilidade da célula, nele encontra-se a peça intermediária, que agregado ao comprimento total da cauda, vai formar o axonema (HAFEZ, 1995). Na peça intermediária há presença das mitocôndrias, que são responsáveis pela produção de energia (YANAGIMACHI, 1994).

A célula espermática é revestida mais externamente pela membrana plasmática, ela é responsável por envolver e isolar todas as estruturas espermáticas, definindo seus limites entre o meio interior e exterior, mediando suas reações (ALBERTS *et al.*, 2004).

A fluidez da membrana é determinada pela proporção entre colesterol:fosfolipídios, quanto mais fluida, menor a quantidade de colesterol na membrana plasmática (AMANN; PICKETT, 1987). Na espermatogênese, o espermatozoide equino possui uma quantidade de colesterol relativamente alta, em torno de 37%, entretanto, a proporção colesterol:fosfolipídios diminui durante o trânsito epididimário nesta espécie (HALL *et al.*, 1991). Os garanhões também possuem uma composição incomum da organização dos lipídeos, há muitos fosfolipídios poli-insaturados, que podem compensar perdas de colesterol, mantendo a dinâmica da bicamada lipídica (FLESCH; GADELLA, 2000).

Outros fatores externos às células espermáticas, tais como pH, temperatura, alterações na composição e osmolaridade do meio proveniente, podem provocar lesões irreversíveis em sua estrutura, limitando a sua capacidade fertilizante (AMANN; PICKETT, 1987). Devido a isso, apenas uma pequena quantidade de células, de bilhões que foram ejaculadas, chegarão ao oviduto (MORRIS *et al.*, 2000).

Durante a passagem pelo epidídimo, o espermatozoide adquire uma cobertura glicoproteica que será acrescida de outras proteínas do plasma seminal, que serão liberadas no momento da ejaculação. A função dessas proteínas é manter a integridade da membrana espermática durante sua passagem pelo trato reprodutivo feminino (TÖPFER-PETERSEN *et al.*, 2005).

No processo denominado capacitação espermática, ocorrem algumas modificações em sua arquitetura e metabolismo no trato reprodutivo feminino para que o espermatozoide consiga se ligar à zona pelúcida e fertilizar o oócito, ou seja, ocorre a preparação para a reação acrossomal, um evento que permite a penetração do espermatozoide e sua fusão com o oolema (NEILD *et al.*, 2005). Após os espermatozoides terem sido capacitados, a longevidade é reduzida no trato reprodutivo da fêmea (ELLINGTON *et al.*, 1999).

A reação acrossomal está relacionada a múltiplos fatores que envolvem a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática, isso possibilita que o conteúdo do acrossoma seja liberado através de canais de membrana (THÉRIEN *et al.*, 1995).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozoide está relacionada a atividade funcional da célula (GARNER; HAFEZ, 1995). É necessário um espermatozoide capacitado, móvel e que sofra reação acrossômica para que haja uma interação entre o oócito maduro e viável e então ocorra o processo de fertilização (CARVALHO; DODE, 2010).

3.3 CONGELAÇÃO DE SÊMEN

A biotécnica da congelação de sêmen iniciou-se a aproximadamente sete décadas, quando foi descoberto o uso do glicerol como crioprotetor, permitindo que espermatozoides fossem congelados (VIDAMENT, 2005).

No entanto, os índices de prenhez obtidos com o uso do sêmen congelado de equinos ainda são muito inferiores aos obtidos com sêmen congelado de bovinos, pois a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides acaba sendo reduzida por conta de possíveis lesões que ocorrem durante o congelamento (HOLT, 2000; MILLER, 2008).

As taxas de confirmação de gestação com uso de sêmen congelado, giram em torno de 25 a 40% por ciclo. Isto porque podem ocorrer injúrias diminuindo seu poder fecundante (SANTOS *et al.*, 2015). Adicionalmente, sabe-se que o sêmen de alguns garanhões apresenta baixa viabilidade após a descongelação (HOFFMANN *et al.*, 2011) e isso pode ser justificado pela individualidade do animal (VIDAMENT, 2005).

As raças também interferem na resistência do espermatozoide a congelação, um exemplo disso são as raças mangalarga e mangalarga marchador que tem uma menor qualidade pós descongelação comparado a outras raças, como por exemplo, quarto de

milha. Alguns autores acreditam estar relacionado a fatores genéticos (ALVARENGA; PAPA, 2011; CANDEIAS, 2010).

O sêmen equino deve manter alguns atributos gerais, como: metabolismo para produção de energia; motilidade progressiva; viabilidade das enzimas localizadas no acrossomo e proteínas na membrana plasmática, importantes para a sobrevivência do espermatozoide dentro do trato reprodutivo feminino e para a ligação do mesmo com a membrana plasmática do oócito para a fertilização. A destruição de componentes da célula espermática, associada com uma ou mais dessas funções, reduzirá consequentemente sua fertilidade (HOLT, 2000; PICKETT; AMANN, 1993).

O processo de congelação espermática é de grande relevância para a indústria da reprodução equina, pois traz a possibilidade de utilização por um período consideravelmente longo (refrigeração) ou indeterminado (congelação), reduz riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores, além de favorecer rápida difusão de material genético entre locais distantes (HOFFMANN *et al.*, 2011; CASTELO *et al.*, 2008).

3.4 EFEITOS DA CRIOPRESERVAÇÃO

O processo de criopreservação das células espermáticas resulta na diminuição da fertilidade quando comparada ao sêmen fresco. Esse prejuízo surge da combinação de alguns aspectos, como perda da viabilidade espermática ou danos na capacidade funcional da membrana espermática, uma vez que a motilidade e a estrutura dos espermatozoides são afetadas de diferentes formas, podendo ocorrer injúrias nas diferentes etapas de congelação e descongelação (WATSON, 2000; SANTOS *et al.*, 2015).

A refrigeração representa o início do estresse térmico submetido às células espermáticas durante o processo de criopreservação, pois a rápida refrigeração do sêmen das diferentes espécies animais, induz a um estresse letal conhecido como choque frio (STORNELLI *et al.*, 2005). O choque térmico pode provocar alguns danos irreversíveis aos espermatozoides, como movimentos anormais, circulares, retrógrado, rápida perda da motilidade, danos ao acrossoma e membrana plasmática, o que pode levar a um aumento de permeabilidade, perda de componentes intracelulares e redução do metabolismo (GRAHAM, 1996).

3.4.1 Estresse Oxidativo

Em busca da viabilidade celular, os espermatozoides e o plasma seminal possuem mecanismos de defesa antioxidante que mantêm adequadas concentrações de espécies reativas de oxigênio (BALL *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2010).

Em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (ERO) mediam funções espermáticas essenciais, como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozoide e oócito (SALEH; AGARWAL, 2002). Entre elas, as mais importantes são: o radical ânion superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2), hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL, 1994).

Se há uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio ou há uma deficiência na função da defesa antioxidante, esse desequilíbrio caracteriza o estresse oxidativo (DIPLOCK, 1994; SALEH; AGARWAL, 2002).

Uma causa que favorece o estresse oxidativo é a remoção do plasma seminal no processo de centrifugação para retirar sobrenadante, tornando o espermatozoide susceptível a não sofrer reação acrossômica, não adentrar a zona pelúcida e não conseguir realizar a fertilização (AL-ESSAWE *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo pode fazer com que a célula se adapte, tolerando um estresse oxidativo de forma moderada, através da ativação do sistema de defesa antioxidante, mas também, se as células forem submetidas a um estresse oxidativo severo, pode haver injúria celular ou ainda, em casos de muita intensidade, levar a morte celular (HALLIWELL, 2001). O que acontece dependerá da quantidade de ERO, do momento e do tempo de exposição (AGARWAL *et al.*, 2003).

Vários artigos mostram que a manipulação do sêmen pode elevar a produção de ERO, e/ou diminuir sua função antioxidante (AGARWAL; SAID, 2005; BAUMBER *et al.*, 2005). O aumento excessivo da concentração de ERO induz à peroxidação lipídica e proteica da membrana plasmática (MORTE *et al.*, 2008). A membrana é uma das mais susceptíveis a ação de ERO, comprometendo sua integridade, o que leva a uma deficiência no controle de entrada e saída de fluidos e nutrientes (STEINER; ADDOR, 2014). Como consequência, traz danos à fita de DNA, resultando, assim, em efeitos indesejados na função espermática (MORTE *et al.*, 2008).

Ortega-Ferrusola *et al.* (2009) observaram uma correlação negativa da lipoperoxidação com a viabilidade espermática, e com o potencial mitocondrial, sugerindo que a lipoperoxidação influencia diretamente na crioresistência do sêmen de alguns garanhões, e também, entre ejaculados dos mesmos.

3.4.2 Lipoperoxidação (LPO)

A lipoperoxidação ou peroxidação lipídica inicia na presença de ERO, causando uma deterioração oxidativa de lipídeos poliinsaturados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015), devido ao contato com ácidos docosaenoicos presentes na membrana espermática, quando isso acontece, é retirado um hidrogênio da ligação dupla, que é transformado em radical livre, ele por sua vez, agirá em outro ácido docosahexanoico (AITKEN; KRAUSZ, 2001).

O espermatozoide equino demonstra ser aparentemente mais resistente à peroxidação da membrana quando comparado ao de outras espécies domésticas (BAUMBER *et al.*, 2000; NEILD *et al.*, 2005). No entanto, o processo de criopreservação aumenta a suscetibilidade do espermatozoide equino à LPO.

A LPO altera a estrutura e permeabilidade da membrana, assim como sua fluidez, podendo prejudicar sua capacidade de fusão, essa é uma habilidade importante e necessária durante a reação acrossomal. Como consequência, influencia na fertilidade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MAIA; BICUDO, 2009; NEILD *et al.*, 2005).

Há ainda a possibilidade de haver morte celular, pois há perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, que culminam com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

3.4.3 Diluidores e Crioprotetores

Para o sêmen ser submetido a baixas temperaturas, utilizam-se diluidores e crioprotetores apropriados (SOUZA *et al.*, 2016). Eles têm função de proteger as células contra as injúrias advindas da desidratação e resfriamento, evitando a formação de gelo intracelular e estresse osmótico (LAYEK *et al.*, 2016). Os diluidores são aquecidos a temperaturas semelhantes aos órgãos sexuais, promovendo um conforto térmico ao espermatozoide (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Há uma grande variedade de diluidores em diferentes composições. Essa variedade pode estar relacionada à sensibilidade espermática ao processo de congelamento e descongelamento do sêmen entre ganhos ou até de um mesmo ganho (SNOECK *et al.*, 2007).

Comumente utilizam-se diluidores e crioprotetores compostos por substâncias que possuem a função de reduzir os efeitos deletérios aos espermatozoides no processo de criopreservação, devido as mudanças bruscas de temperatura. Em geral, utilizam-se leite desnatado, gema de ovo, açúcares, glicerol e eletrólitos em diferentes concentrações (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Embora os crioprotetores sejam essenciais ao processo de congelamento dos espermatozoides, eles podem apresentar efeitos tóxicos e diminuir as taxas de fertilidade quando em concentrações elevadas (DE VITA, 2006).

O glicerol é um dos crioprotetores mais utilizados na espécie equina, apesar de seus efeitos tóxicos (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A dimetilformamida e a metilformamida tem sido utilizadas no sêmen equino e vem se destacando ao apresentar melhores quando comparados com o glicerol, podendo associa-los para obter melhores índices de fertilidade pós descongelamento. O etilenoglicol se associado a gema de ovo, também pode ser empregado sem interferir na fertilidade (CASTRO, 2016).

Faz-se necessário ressaltar que, a composição adequada para um diluidor seminal não depende apenas de uma adequada concentração de crioprotetores, tanto intra como extracelulares, mas de uma combinação adequada de todas as substâncias que são utilizadas (SNOECK *et al.*, 2007).

3.4.4 Antioxidantes

No sêmen existem diferentes tipos de antioxidantes com a função de manutenção da viabilidade das células (LAHNSTEINER *et al.*, 2010).

Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (ANDREYEV *et al.*, 2005), os enzimáticos são o primeiro método de defesa da célula espermática, eles conseguem neutralizar o aumento excessivo de ERO, alguns exemplos são: Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (NOGUEIRA *et al.*, 2013). Já os antioxidantes não enzimáticos atuam como reparadores dos danos causados

pela ação de ERO, destacam-se o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E) (ANDRADE *et al.*, 2010).

Os antioxidantes podem agir de duas maneiras nas células espermáticas, eles podem impedir a produção de ERO, como interromper a reação em cadeia que ocorre (SILVA; GUERRA, 2012).

Entretanto, eles não são suficientes para conferir proteção total à membrana plasmática (acrossoma e cauda), sendo necessário suplementar essa defesa limitada com a proteção conferida pelo plasma seminal, que contém antioxidantes enzimáticos (ALVAREZ & STOREY, 1989) responsáveis por neutralizar a ação do O_2 e H_2O_2 ; além de uma variedade de antioxidantes não enzimáticos, como ácido ascórbico, urato, α -tocoferol piruvato, taurina e hipotaurina (AGARWAL; SALEH, 2002).

Ao ser diluído com solução crioprotetora, o sêmen reduz suas defesas antioxidantes e consequentemente a proteção das células também (CABRITA *et al.*, 2011).

Com o objetivo de melhorar os índices de fertilidade com a utilização do sêmen criopreservado, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos para manter a integridade do espermatozoide durante as etapas de refrigeração e congelamento. Dentre tais pesquisas, evidencia-se a importância dos antioxidantes na proteção celular durante os procedimentos de manipulação espermática e redução da temperatura, com o intuito de reduzir as crioinjúrias ocasionadas pelo estresse oxidativo (GUERRA *et al.*, 2004).

Como benefícios da ação de substâncias antioxidantes adicionadas aos meios diluidores, espera-se que ocorra um retardo na velocidade da oxidação, havendo uma manutenção de ERO a níveis fisiológicos (PUGLIESI *et al.*, 2012).

3.4.5 Gás Ozônio (O_3)

O ozônio foi descoberto no século XIX (SILVA *et al.*, 2011), encontra-se na estratosfera ao redor da terra e é um dos gases mais importantes, pois tem a função de proteção das radiações ultravioletas (CICERONE, 1987).

De forma artificial, o ozônio pode ser originado do oxigênio (O_2), condição possível através de um equipamento gerador de ozônio. O cilindro de O_2 fica acoplado ao aparelho, que sofre descargas elétricas e se transforma em duas moléculas de

oxigênio atômico (O), que irão se unir novamente a moléculas de oxigênio e originar o ozônio (O₃) (VILARINDO, 2013).

É um potente agente oxidante que promove um estresse oxidativo, porém seu efeito é paradoxo (RIFA *et al.*, 2005), apesar de ser considerado oxidante, ele induz a elevação dos sistemas enzimáticos antioxidantes por se tratar de uma molécula triatômica (ALVES *et al.*, 2004).

Pela sua composição, tem uma ação mais seletiva sobre os compostos orgânicos (RIFA, 2005). Seu uso ocorre em diversas áreas, podemos citar a higienização dos alimentos (FREITAS-SILVA; VENÂNCIO, 2010), tratamento de doenças, antisséptico, entre outros (ABOZ, 2016).

Quando administrada de forma correta, esta terapia tem obtido resultados de impacto positivo no que diz respeito a sua aplicação (SANCHEZ, 2008). Com suas atividades terapêuticas e biológicas, o ozônio é responsável por um mecanismo que relaciona os produtos gerados pela interação do gás com componentes orgânicos da célula (GARCIA *et al.*, 2008). Já são conhecidas algumas propriedades terapêuticas do O₃, como sua propriedade antimicrobiana, cicatrizante, entre outras. Na forma sistêmica apresenta ação analgésica, anti-hipóxia, anti-inflamatória e imunomoduladora (REIS *et al.* 2018).

O efeito que o ozônio tem sobre as células é dose dependente (KOWALSKI, *et al.*, 1998), mesmo com inúmeros benefícios, seu excesso traz efeitos nocivos ao paciente (VIGLINO, 2008). Sua maior interação ocorre com moléculas de DNA, substâncias de ligações duplas, fluidos e tecidos (TAPIA, 2012).

Quando em contato com fluidos (sangue, plasma, solução fisiológica, urina, etc), o O₃ se dissolve na água presente nos fluidos e começa a atuar de forma extremamente rápida. Os antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos presentes, absorvem uma certa quantidade de ozônio que resulta na produção de ERO e radicais livres, onde vão causar uma diminuição dessas defesas neste fluido. Em doses dentro da janela terapêutica elas conseguem se recuperar e começam a cumprir sua função antioxidante (TAPIA, 2012).

Existem vários estudos com O₃ na medicina humana e em animais de laboratório, já na Medicina Veterinária, é uma terapia que vem crescendo e atraindo o interesse dos pesquisadores (MOREIRA, 2015).

Merhi *et al.*, em 2018, analisaram um compilado de estudos relativos ao efeito da ozonioterapia na reprodução masculina e perceberam que a maioria deles foi realizado em animais, com resultados que mostram que a ozonioterapia potencializa a função de proteção do sistema imunológico e como consequência, protege significativamente o testículo de uma isquemia testicular em casos de torção testicular, reduzindo os marcadores de estresse oxidativo que geralmente aumentam nesses casos, age contra o efeito de agentes gonadotóxicos e trata infecções bacterianas que podem estar presentes no sêmen.

Pesquisadores também realizaram um estudo sobre o uso do ozônio para controlar patógenos ou contaminantes no sêmen bovino. Para isso, utilizaram amostras de sêmen e diluíram no leite ozonizado. Os resultados deste experimento indicam que a concentração e o tempo de exposição ao O₃ podem ser selecionados para reduzir *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Campilobacter foetus* no sêmen de touros contaminados, tendo apenas efeitos mínimos na motilidade espermática (GRADIL *et al.*, 1995).

Trata-se de um gás altamente instável que tem sua degradação muito rápida, por isso, ao voltar a estabilidade do O₂, ele e seus radicais livres são altamente reativos e capazes de oxidar vírus, bactérias, compostos orgânicos, assim como inorgânicos que entrem em contato com o mesmo (LAM, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Antes da experimentação direta com os animais, o projeto foi submetido e aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPB) sob número de protocolo 4277190820.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ejaculados de quatro garanhões da raça Quarto de Milha, com idade entre seis e vinte e três anos, submetidos ao mesmo manejo (animais estabulados, sendo fornecidos 3,0 kg/animal/dia de concentrado, feno de tifton e água *ad libitum*), clinicamente saudáveis, com histórico de fertilidade e submetidos a exame andrológico. Os animais foram oriundos da Central Monte Verde de Reprodução Equina, situada em Sairé, Pernambuco, Brasil (latitude: 8° 19' 42" Sul, longitude: 35° 41' 23" Oeste). As amostras de sêmen foram obtidas no período de março e abril de 2021.

4.2 COLHEITA E ANÁLISE DE SÊMEN

Foram colhidos seis ejaculados de cada garanhão, totalizando 24 ejaculados, as colheitas foram realizadas em dias alternados, os ejaculados foram obtidos através do método de vagina artificial (modelo Botucatu), com o auxílio de um manequim. Na vagina artificial foi acoplado um copo coletor composto por camisinha plástica e filtro de nylon para remoção da fração gel.

Os ejaculados foram avaliados imediatamente após a colheita (CBRA, 2013), durante a avaliação as amostras foram mantidas em placa aquecedora a 37 °C, foram realizadas análises macroscópicas (volume, cor, aspecto e odor) e microscópicas (motilidade e vigor espermático) através do método de análise computadorizada (Mace Sperm Tracker – Anturius, Brasil) com câmera acoplada a um microscópio óptico (BEL Tech Bio 2, BEL Engineering®, Itália). A concentração espermática foi determinada através da câmara de Neubauer, utilizando diluição (1:20) em água destilada, em microscopia óptica em aumento de 40x (BEL Tech Bio 2, BEL Engineering®, Itália).

4.3 DILUIÇÃO E TRATAMENTOS

O ejaculado de cada equino foi diluído, na proporção de 1:1, em diluidor comercial a base de leite desnatado (BotuSêmen®, Botupharma, Brasil), submetido à centrifugação (600 xg, durante 10 minutos) para remoção do plasma seminal. Após centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi ressuspenso em diluidor comercial a base de gema de ovo (BotuCRIO®, Botupharma, Brasil), na concentração de (200×10^6) espermatozoides/mL). De acordo com o grupo experimental, o diluidor BotuCRIO® foi ozonizado através de um aparelho conversor de oxigênio em gás ozônio (Modelo O&L portátil, Ozone & Life® - São José dos Campos – Brasil) na proporção de 1:1 em volume de ozônio e volume de diluidor, homogeneizado em seringa durante 60 segundos.

Cada ejaculado, após centrifugação, foi separado e adicionado imediatamente após ozonização do diluidor em quatro grupos: grupo controle (GC, meio comercial BotuCRIO®, sem adição de gás ozônio), grupo I (meio comercial BotuCRIO®, ozonizado com 6 µg de O₃/mL), grupo II (meio comercial BotuCRIO®, ozonizado com 8 µg de O₃/mL) e grupo III (meio comercial BotuCRIO®, ozonizado com 12 µg de O₃/mL). Os ejaculados foram homogeneizados junto ao diluidor ozonizado durante 60 segundos. Na sequência, as amostras foram envasadas em palhetas (0,5 mL), devidamente identificadas, lacradas com álcool polivinílico e submetidas à criopreservação.

4.4 CONGELAÇÃO

O processo de criopreservação foi realizado em máquina de congelamento programável (TK 3000 CSE, TK Tecnologia em Congelamento LTDA, Uberaba, MG, Brasil). Inicialmente, as palhetas, em temperatura ambiente (28 °C), foram submetidas à curva de refrigeração (-0,5 °C/min) até atingir 5 °C, e mantidas nesta temperatura por 20 minutos (período de estabilização). Após este período de refrigeração, as amostras foram submetidas à curva de congelamento (-15 °C/min) até atingir a temperatura de -120 °C (15 a 20 minutos), então foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em botijões criogênicos a -196 °C.

4.5 DESCONGELAÇÃO E ANÁLISE DO SÊMEN

No momento das análises, duas palhetas de cada grupo experimental foram retiradas dos botijões criogênicos e descongeladas em banho-maria a 37 °C/30 segundos. Após isso, foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR), considerando M0= imediatamente pós-descongelação, M30= 30 minutos pós-descongelação e incubação (37 °C) e M60= após 60 minutos de descongelação e incubação (37 °C). A cada tempo foram avaliadas a cinética espermática, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e potencial de membrana mitocondrial.

4.5.1 Cinética Espermática

As variáveis a seguir foram analisadas através do sistema computadorizado de análise espermática (CASA; SCATM, Microptics, S.L. Version 5.1, Barcelona, Espanha): motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), velocidade média do percurso (VAP; $\mu\text{m/s}$), frequência do batimento flagelar cruzado (BCF; Hz), amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH; μm), retilinearidade (STR; %), linearidade (LIN; %) e índice de oscilação (WOB, %).

Alíquotas de cada amostra (2,5 μL) de sêmen foram avaliadas individualmente sobre lâmina coberta com lamínula (18 x 18 mm), pré-aquecidas a 37 °C, e examinadas em microscópio de contraste de fase (100x, Eclipse 50i, Nikon, Japan), com objetiva de 10x, acoplado ao sistema CASA. Foram capturados pelo menos 500 espermatozoides por amostra, em cinco campos aleatórios, não consecutivos, selecionados pelo mesmo operador.

Os parâmetros do sistema CASA foram ajustados segundo Nery *et al.* (2020), com as seguintes configurações: temperatura de 37 °C; ampliação 100 x; número de imagens por segundo 24; área da cabeça, 10-70 μm^2 ; VAP: 10 $\mu\text{m/s}$ lentos; <45 $\mu\text{m/s}$ médio; <90 $\mu\text{m/s}$ rápidos; progressividade 75% STR; circular 50% LIN.

4.5.2 Testes de integridade celular

Os testes de integridade de membrana plasmática e de acrossoma, assim como de atividade mitocondrial, foram realizados utilizando sondas fluorescentes em microscopia de epifluorescência (Axiostar plus, Zeiss, Alemanha), duzentas células espermáticas foram contadas por lâmina, com uma ampliação de 40x, para membrana

plasmática e mitocôndrias e 100x, para acrossoma, foram classificadas com base na fluorescência emitida de cada sonda.

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções estoque de fluoróforos foram preparadas como segue: iodeto de propídio (25 mg/mL), JC-1 (5 mg/mL) e FITC conjugado com *Peanut agglutinin* (FITC-PNA, 1 mg/mL) em solução tampão fosfato salina (PBS); as soluções de trabalho foram JC-1 (153 μ M) em dimetilsulfóxido (DMSO), FITC-PNA (0,04 mg/mL) e IP (0,5 mg/mL) em PBS e diacetato de carboxifluoresceína (DIC; 0,46 mg/mL em DMSO). Todas as soluções foram mantidas a -20 °C até o uso.

Previamente as análises de integridade de membrana plasmática (iMP) e potencial de atividade mitocondrial (PMM) foi diluído 200 μ L de sêmen em tris-lavagem (500 μ L), centrifugado (100xg/5min) e ressuspendido em tris (60 μ L), logo após foi separado 30 μ L para avaliação de iMP e 30 μ L para PMM.

A integridade de membrana plasmática (iMP) foi avaliada segundo Araújo Silva *et al.* (2019), pelo método de coloração dupla de fluoróforos de iodeto de propídeo (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (DIC), detectado pela inclusão de IP no núcleo da célula. A alíquota de amostra (30 μ L) foi corada com 5,0 μ L de DIC e 5,0 μ L de IP e incubada por um período de 10 min a 25° C. Os espermatozoides foram avaliados utilizando filtros de excitação DBP 485/20 nm e DBP 580–630 nm. Os espermatozoides corados em verde foram considerados intactos e os que estavam corados em vermelho foram considerados como tendo membrana danificada.

O potencial de atividade mitocondrial (PMM) foi avaliado utilizando um fluoróforo catiônico lipofílico (JC-1) associado ao IP. A alíquota de amostra (30 μ L) foi corada com 5,0 μ L de JC-1 e incubada durante 10 min a 25 ° C. Os espermatozoides foram avaliados usando excitação BP 450–490 nm e filtros de emissão LP 515. Os espermatozoides com peça intermediária corada em laranja foram considerados como tendo um alto PMM, enquanto os espermatozoides com peça intermediária verde foram considerados como tendo um baixo PMM (ARAÚJO SILVA *et al.*, 2019).

A avaliação de integridade de acrossoma (iAC), foi feita através de Isotiocianato de Fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA). Uma alíquota (10 μ L) da amostra foi usada para fazer um esfregaço, seco ao ar. As lâminas foram coradas com alíquotas de 10-20 μ L de FITC-PNA e incubadas em câmara úmida a 4 °C por 15 min

na ausência de luz. Em seguida, as lâminas foram imersas em PBS (Tampão fosfato salina) duas vezes e secas ao ar. Imediatamente antes da avaliação, 5,0 µL de solução de UCD (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5,0 mg de p-fenilenodiamina) foram colocados na lâmina e então cobertos com uma lamínula. Os espermatozoides foram avaliados usando um filtro de excitação BP 450–490 nm e emissão LP 515 nm (ARAÚJO SILVA *et al.*, 2019).

Os espermatozoides em que o acrossoma foi corado com verde fluorescente foram considerados como tendo um acrossoma intacto. Quando apenas a região equatorial da cabeça do espermatozoide era verde fluorescente ou quando a fluorescência estava ausente, os espermatozoides eram considerados como tendo um acrossoma danificado.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad InStat (versão 3.10, 2009). As variáveis expressas em porcentagem foram transformadas por arco seno ($\arcsin \sqrt{P/100}$). Os dados foram submetidos inicialmente a um teste de normalidade (Kolmogorov-Sminorv), para identificação da distribuição dos dados e escolha de testes paramétricos ou não paramétricos. Após a identificação, os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey, se paramétrico, ou Kruskal-Wallis, se não-paramétrico. Todos os testes descritos foram realizados com, no mínimo, nível de confiança de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Os resultados de cinética do sêmen de equinos congelado com diferentes concentrações de ozônio estão apresentados na Tabela 1, onde observa-se que para os parâmetros de MT, LIN, STR, WOB, ALH e BCF não houve diferença ($p>0,05$) entre o grupo controle e os tratamentos (6, 8 e 12 μg de O_3/mL), em nenhum dos tempos avaliados.

Para os parâmetros de VCL, VSL e VAP, não houve efeito significativo ($p>0,05$) entre os grupos experimentais no momento imediato à descongelação (0h). Aos 30 minutos, para os três parâmetros, o grupo tratado com 6 μg de O_3/mL foi superior ($p<0,05$) ao de 12 μg de O_3/mL e não diferiram ($p>0,05$) do controle e do 8 μg de O_3/mL . Na avaliação de 60 minutos de incubação, VCL e VAP dos grupos controle e 6 μg de O_3/mL , foram maiores ($p<0,05$) que o de 12 μg de O_3/mL e não diferiram ($p>0,05$) do 8 μg de O_3/mL . Para VSL, após 60 minutos, o 6 μg de O_3/mL foi maior ($p<0,05$) que o 12 μg de O_3/mL e não diferiu ($p>0,05$) do controle e do 8 μg de O_3/mL .

Quanto a avaliação durante todo o tempo de incubação, pode-se observar que para os parâmetros de MT, MP, VCL, VSL e VAP, houve redução destes índices ($p<0,05$) em todos os grupos estudados. Entretanto, LIN, STR, WOB, ALH e BCF se mantiveram estáveis ($p>0,05$) ao longo do tempo de incubação em todos os grupos experimentais.

Os resultados de integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e potencial de membrana mitocondrial estão expostos na Tabela 2. Não houve incremento ($p>0,05$) no percentual de células com membrana plasmática e acrossoma intactos com o tratamento dos espermatozoides de garanhões com O_3 , em todos os tempos avaliados. Já para o PMM houve redução ($p<0,05$) no número de células apresentando alto PMM. No momento 0h houve redução ($p<0,05$) nos grupos tratados com 8 μg de O_3/mL e 12 μg de O_3/mL , quando comparados ao controle, sendo o 12 μg de O_3/mL também inferior ($p<0,05$) ao 6 μg de O_3/mL . Aos 30 minutos de incubação, o grupo 12 μg de O_3/mL também se mostrou inferior ($p<0,05$) ao controle e, no momento 60 minutos, não houve diferença ($p>0,05$) entre os grupos.

Na avaliação entre os tempos de avaliação (0, 30 e 60 minutos), para estes parâmetros, houve redução ($p<0,05$) no percentual de células com membrana plasmática

íntegra e com alto PMM ao longo do tempo para todos os grupos. Já o percentual de células com acrossomas íntegros se manteve ($p>0,05$) ao longo do período de incubação em todos os grupos.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se o efeito da adição de O₃ ao diluidor de criopreservação de sêmen equino sob a cinética, integridade de membrana plasmática, integridade de acrossoma e potencial de membrana mitocondrial, imediatamente após o descongelamento e durante 30 e 60 minutos de incubação a 37 °C. O teste de termorresistência (TTR) foi realizado por oferecer maior confiabilidade na mensuração dos parâmetros espermáticos e indicadores de fertilidade dos espermatozoides *in vitro* (FOSTER *et al.*, 2011) e tem o intuito de simular a permanência dos espermatozoides no trato genital da fêmea (ARRUDA *et al.*, 1992).

Com isso, pode-se observar que houve redução dos parâmetros de MT, MP, VCL, VSL e VAP em todos os grupos ao longo do TTR, padrão também encontrado nas análises de iMP e PMM. Vários autores incrementaram em seus estudos o uso do TTR para observar a longevidade das células espermáticas pós descongelação. Fürst *et al.* (2005), por exemplo, também avaliaram a longevidade do sêmen equino descongelado e observaram que, independente do protocolo, houve queda da motilidade espermática ao longo do TTR, como observado no presente estudo. A diminuição na iMP após o TTR pode ser justificada pelos danos causados nas estruturas e organelas envolvidas na movimentação espermática durante o processo de congelação/descongelação (WATSON, 1995, *apud* SANTOS *et al.*, 2015).

As análises cinéticas também revelaram não haver benefícios em ozonizar o diluidor de congelação em relação aos parâmetros de MT, LIN, STR, WOB, ALH e BCF, que permaneceram preservados de forma semelhante em todos os grupos e tempos. Esses resultados complementam os relatos de Santos *et al.* (2018), que, ao ozonizarem o diluidor com 8 mg de O₃/L e adicionarem ao sêmen fresco e refrigerado, não observaram diferenças nos percentuais de MT, MP e na integridade da membrana plasmática nos dois momentos avaliados.

Quanto aos valores encontrados para as velocidades, observou-se que há uma correlação negativa entre uma maior concentração de O₃ e as velocidades de VCL, VSL e VAP, enquanto concentrações mais baixas foram semelhantes a ação do grupo controle. Esses são parâmetros importantes nas taxas de fertilização (SILVA *et al.*, 2017), pois em 2002, Verstegen *et al.* relataram haver correlação positiva entre as taxas

de fertilização e os valores de velocidade, sendo os valores de VCL, VSL e VAP superiores quando possuíam um maior potencial de fertilização.

A concentração de 12 μg de O_3/mL pode ter causado toxicidade à célula espermática. Sagai; Bocci (2011) afirmaram que doses de 10 a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ são consideradas seguras para fluidos, porém existem poucos relatos na literatura no que diz respeito à adição de ozônio ao sêmen, portanto, são insuficientes para que possam ser discutidas doses seguras em seu uso.

A iMP não foi afetada pela adição de ozônio em relação ao grupo controle e tratamentos, o que complementa os estudos de Santos *et al.* (2018), que demonstraram que a adição do sêmen ao diluidor ozonizado não alterou os percentuais de membrana plasmática íntegra em sêmen fresco e refrigerado.

O iAC também não foi influenciado pelos tratamentos. Segundo Watson *et al.* (1987 *apud* SOARES, 2018), na região da cabeça do espermatozoide, para que haja uma lesão do acrossoma, é preciso que a membrana plasmática também seja lesada, pois é uma membrana mais externa e uma proteção a mais para o acrossoma, o que confirma os resultados mencionados anteriormente entre iMP e iAC, a integridade de uma depende da integridade da outra.

Estes são fatores essenciais para manutenção do metabolismo do espermatozoide, capacitação e reação acrossomal. A fertilização só acontece se o acrossoma estiver intacto (SILVA; GADELLA, 2006).

Já em relação ao PMM, houve redução de células com alto PMM nos tratamentos com maiores concentrações de O_3 em relação ao controle (8 e 12 μg de O_3/mL). Como se sabe, a mitocôndria é essencial na fisiologia espermática e tem sua produção de energia gerada pela síntese de ATP, precedendo a fosforilação oxidativa, o que possibilita o movimento do espermatozoide (CÂMARA; GUERRA, 2008).

Com a redução do PMM, é perceptível que maiores concentrações de ozônio atuam diretamente na mitocôndria de maneira negativa. Se fizermos uma relação com a ação antimicrobiana do O_3 , segundo Caetano *et al.* (2021), o ozônio penetra a célula, recombina-se com elementos citoplasmáticos, oxida os glicopeptídeos, as glicoproteínas e os aminoácidos da parede celular, modifica a permeabilidade celular, promove um colapso na atividade enzimática e culmina na lise celular.

Baseado no comportamento da atividade do ozônio com os microrganismos, a redução do potencial mitocondrial observada neste estudo pode ter sido ocasionada pela maior concentração de O_3 , logo, interferiu no funcionamento da célula espermática e de suas organelas, e como consequência, as mitocôndrias foram afetadas, o que justifica a redução do potencial mitocondrial nestes grupos.

Em síntese, a produção excessiva de radicais livres e ERO originadas da adição de concentrações elevadas de O_3 podem contribuir para o dano mitocondrial, com consequente redução na síntese de ATP, mudança na trajetória linear e redução da velocidade, o que aumenta consideravelmente a proporção de espermatozoides estáticos (ORTEGA-FERRUSOLA *et al.*, 2009), o que justificaria as alterações encontradas no presente trabalho, como PMM, VCL, VSL e VAP reduzidos nos tratamentos com concentrações maiores de ozônio.

O espermatozoide possui duas fontes de defesa antioxidante, o sistema enzimático, que possui capacidade de defesa limitada (ZINI *et al.*, 2000) e o plasma seminal, que tem extrema importância na proteção da célula contra efeitos nocivos do estresse oxidativo (BUCCI *et al.*, 2016); porém, neste experimento, o plasma seminal foi retirado no processo de centrifugação, o que poderia explicar uma ausência de uma resposta antioxidante estimulada pelo O_3 .

Deve-se considerar que o meio diluidor comercial geralmente possui antioxidantes em seus componentes, o que nos mostra que mesmo com a proteção desses antioxidantes, os espermatozoides expostos à concentração de 6 μg de O_3/mL não apresentaram alterações em relação ao grupo controle, pois a concentração é insuficiente para desencadear a cascata de ação terapêutica do O_3 e acima de 6 μg de O_3/mL conduziu a uma oxidação exacerbada e as células não conseguiram produzir uma defesa antioxidante capaz de justificar seu uso no sêmen.

7 CONCLUSÃO

O ozônio adicionado ao diluidor de congelação de sêmen equino, na menor concentração testada (6 μg de O_3/mL) não interfere positivamente nos parâmetros de cinética e integridade celular pós-descongelação, entretanto, nas maiores concentrações (8 e 12 μg de O_3/mL), provoca redução dos parâmetros cinéticos e do potencial de membrana mitocondrial. Desta forma, a adição do ozônio ao diluidor de congelação, nas concentrações testadas, não apresenta benefícios à prática da criopreservação de espermatozoides equinos.

REFERÊNCIAS

ABOZ - Associação Brasileira de Ozonioterapia. **Disponível em:**
<http://www.aboz.com.br>. Acesso: 06 de maio de 2021.

AFFONSO, F. J. **Efeito do uso dos antioxidantes melatonina, ácido ferúlico e mioinositol sobre a motilidade, integridade de membranas e produção de espécies reativas de oxigênio em sêmen equino refrigerado.** - Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. Universidade de São Paulo. São Paulo, 78 f., 2013.

AGARWAL, A.; SAID, T.M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU international**, v. 95, n. 4, p. 503-507, 2005.

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

AITKEN, R. J., KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p. 497-506, 2001.

AL-ESSAWE, E.; WALLGREN, M.; WULF, M.; AURICH, C.; MACÍAS-GARCÍA, B.; SJUNNESSON, Y.; MORRELL, J. Seminal plasma influences the fertilizing potential of cryopreserved stallion sperm. **Theriogenology** v. 115, p. 99-107, 2018.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. In: _____. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 10, p. 583-595, 2004.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Principais avanços no processamento e aplicação do sêmen congelado de equinos. **Spermova**, v.1, p.7-10, 2011.

ALVES, G. E. S.; ABREU, J. M. G.; RIBEIRO FILHO, J. D.; MUZZI, L. A. L.; OLIVEIRA, H. P.; TANNUS, R.J.; BUCHANAN, T. Efeitos do ozônio nas lesões de reperusão do jejuno em equinos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, p.433-437, 2004.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKinnon, AO, Voss JL. **Equine reproduction**. Pennsylvania: Lea & Febiger, cap. 80, p.715-45, 1993.

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

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

ANDREYEV, A.Y.; KUSHNAREVA, Y.E.; STARKOV, A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry**. 70:200-14, 2005.

ANUALPEC 2019. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2019. Ed. Argos, 400p.

ARAÚJO SILVA, R.A.J., BATISTA, A.M., ARRUDA, L.CP., SOUZA, H.M., NERY, I.H.A.V., GOMES, W.A., SOARES, P.C., SILVA, S.V., GUERRA, M.M.P. Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat semen related with seminal plasma removal. **Animal Reproduction**, 16, 895–901, 2019.

ARRUDA, R. P.; BARNABE, V. H.; ALENCAR, M. M.; BARNABE, R. C. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, n.1, p.131-7, 1992.

BALL, B.A. The effects of oxidative stress on equine sperm function, semen storage and stallion fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, p.95-96, 2000.

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

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

BARBOSA, K. B. F; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J. Assessment of cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v.57, n. 5, p. 772-779, 2005.

BRANDÃO, A. C. **Efeitos do laser diodo sobre as características de motilidade, integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal. Universidade de São Paulo. São Paulo, 87 f., 2008.

BUCCI, D.; GIARETTA, E.; SPINACI, M.; RIZZATO, G. ISANI, G.; MISLEI, B.; MARI, G.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Characterization of alkaline phosphatase activity in seminal plasma and in fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.85, p.288- 295, 2016.

CABRITA, E.; MA S.; DIOGO, P.; MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; SARASQUETE, C.; DINIS, M.T. The influence of certain aminoacids and vitamins on post- thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 125, n. 4, p. 189-195, 2011.

CAETANO, M.H.; SIQUEIRA, J.P.; ANDRADE, D.; SOUSA, A.F.; RIGOTTI, M.A.; DINIZ, M.O.; ALMEIDA, W. A.; FERREIRA, A. M.; TERESA, M.; ALMEIDA, G. Antimicrobial action of ozone gas on surfaces and in the air. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 34, 2021.

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.93-99, abr./jun. 2008.

CANDEIAS, M. L. **Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga marchador**. Dissertação (Mestrado) - Clínica e Reprodução Animal. Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, 105 f., 2010.

CANISSO, I.F.; SOUZA, F.A.; SILVA, E.C.; CARVALHO, G.R.; GUIMARÃES, J.D.; LIMA, A.L. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 6, n. 3, p. 389-398, 2008.

CARVALHO, J.O.; DODE, M.A.N.; Técnica de coloração com peanut agglutinin (PNA) – isotiocianato de fluoresceína (FITC) para avaliação de integridade de acrossoma de espermatozóides bovinos. **Embrapa Documentos 328**, Brasília: DF, 2010. 21p.

CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, p.67-75, 2008.

CASTRO, C.S.; PAULA, R. S.; LOPES, J. C. S.; SANTOS, K. J. G.; SANTOS, A. P. P.; NEVES, R. B. S.; FERREIRA, C. S.; PEREIRA, C. C.; MACIEL, E. B.; SANTOS, L. H. F. Utilização de crioprotetores no congelamento de sêmen equino. **Anais... Semana Acadêmica do Curso de Zootecnia – X SEZUS**, 2016.

CICERONE, R.J.; Changes in stratospheric ozone. **Science**, v. 237, p. 35-42, 1987.

DE ANDRADE, R. R.; DE OLIVEIRA-NETO, O. B.; BARBOSA, L.T.; SANTOS, I. O.; DE SOUSA-RODRIGUES, C.; BARBOSA, F. T. Effectiveness of ozone therapy compared to other therapies for low back pain: a systematic review with meta-analysis of randomized clinical trials. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 69, n. 5, p. 493–501, 2019.

EDDY, E.M. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Physiology of reproduction**. New York: Elsevier, v.1, p.3-54, 2006.

ELLINGTON, J.E.; SAMPER, J.C.; JONES, A.E.; OLIVER, S.A.; BURNETT, K.M.; WRIGHT, R.W. In vitro interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products. **Animal Reproduction Science**, v. 56 p. 51-65, 1999.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.1-16, 1997.

FILHO, F. R. M. B. **PERFIL DA CRIAÇÃO DE EQUINOS COMPETIDORES DE VAQUEJADA AVALIAÇÃO** – Monografia (Graduação) – Departamento de Zootecnia. Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 38 f., 2014.

FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p.197-235, 2000.

FOSTER, M.L.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; BRINSKO, S.P.; HINRICHS, K.; TEAGUE S.; LACAZE, K.; BLANCHARD, T. L. Comparison of Methods For Assessing Integrity Of Equine Sperm Membranes. **Theriogenology**, 76:334–41, 2011.

FREITAS-SILVA, O; VENÂNCIO, A. Ozone applications to prevent and degrade mycotoxins: a review. **Drug Metabolism Reviews**, 42: 612–20, 2010.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M. C. O.; RUAS, J. R. M.; BORGES, A. M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.599-607, 2005.

GARCIA, C.A.; STANZIOLA, L.; ANDRADE, I.C.; NEVES, S.M.N. Autohemoterapia maior ozonizada no tratamento de habronemose em equino – relato de caso. In: **35º CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, Gramado, Rio Grande do Sul; p.3-4, 2008.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóide e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6.ed. São Paulo: Editora Manole. cap.7, p.167-190, 1995.

GRADIL, C.; EAGLESOME, M.D.; STEWART, B.; GARCIA, M.M.; QUIMBY, F. Bactericidal effects of ozone at nonspermicidal concentrations. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.59, p.183–6; 1995.

GREENE, A.K.; FEW, B.W.; SERAFINI, J.C. A comparison of ozonation and chlorination for disinfection of stainless steel surfaces. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.11, p.3617-3620; 1993.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.H.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, p.187-195, 2004.

HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: _____. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Manole. Cap. 24, p. 513- 535, 1995.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed., Oxford University Press: New York, 1999. 936p.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs & Aging**, Auckland, v. 18, p. 685-716, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [s.l.] Oxford University Press, 2015.

HERNÁNDEZ, O.D.; GONZÁLEZ, R.C. Ozonoterapia en úlceras flebostáticas. **Revista Cubana de Cirugía**, v. 40, p.123-129, 2001.

HOFFMANN, N; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C; ROHN, K.; SIEME, H. Concentrações ótimas de agentes crioprotetores para o sêmen de garanhões classificados como "bons" ou "ruins" para congelamento. **Animal Reproduction Science**, v.125, n.1-4, p.112-8, 2011.

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

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

HORTA, C.; MULLER, H. Histologia do envelhecimento do sistema tegumentar. In: STEINER, D.; ADDOR F. Envelhecimento cutâneo. Rio de Janeiro: **AC Farmacêutica**, p, 14-20, 2014.

INAL, M., A.; DOKUMACIOGLU, E.; OZCELIK O.U. The effects of ozone therapy and coenzyme Q(1)(0) combination on oxidative stress markers in healthy subjects. **Irish Journal of Medical Science**, v. 180, p.703-707, 2011.

KOWALSKI, W. J.; BAHNFLETH, W. P.; WITTAN, T. S. Bactericidal effects of High Airbone Ozone Concentrations on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. **Ozone Science & Engineering**, v. 20, p. 205-222, 1998.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; PLAETZER, C. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. **Animal Reproduction Science**, v.119, p.314-321, 2010.

LAM, K. K. K. Ozone Disinfection of SARS-Contaminated Areas. **Hong Kong**, p.1-6, 2008.

LAYEK, S.S., MOHANTY, T.K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J.E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction Science**, v.172, p-1-9, 2016.

LI, P.; XI, M.D.; DU, H.; QIAO, X.M.; LIU, Z.G.; WEI, Q.W. Antioxidant supplementation, effect on post-thaw spermatozoa function in three sturgeon species. **Reproduction in Domestic Animals**, v.53, n.2, p.287-295, 2017.

LUCIO, C. F.; REGAZZI F.M., SILVA, L.C.G.; ANGRIMANI, D.S.R.; NICHI, M., VANNUCCHI, C. I. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1568–1575, 2016.

MACEDO, I.N. **AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER EM GARANHÕES QUARTO DE MILHA** – Monografia (Graduação) – Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 46 f., 2017.

MAIA, D. S. A vaquejada: de festa sertaneja a espetáculo nas cidades. In: ALMEIDA, Maria Geralda; RATTS, Alecsandro J.P. **Geografia: Leituras Culturais**. Alternativa, p. 159-183, 2008.

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

MANOTO, S.L.; MAEPA, M.J.; MOTAUNG, S.K. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.25, p.672-679, 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo. **Disponível em:** <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>>. Acesso em: 19 de maio de 2021.

MARIZ T.M.A., ANJOS A.G., FLOR J.M., FLOR L.M.A.M., LIMA C.B., GIVISIEZ P.E.N.; AZEVEDO P.S. Influências do clima sobre a atividade reprodutiva de éguas da Raça Mangalarga Machador no Estado de Sergipe. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, p.39-43, 2008.

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M.T.; HERRÁEZ, M.P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, v.77, n.6, p.1129-1136, 2012.

MERHI, Z., BAZZI, A., MOSELEY-LARUE, R., MOSELEY, A. R., SMITH, A. H., ZHANG, J.; RUGGIERO, M. Ozone Therapy: Overview of its Potential Utility in Male Reproduction. **American Journal of Immunology**, v. 14, n.1, p.15-25, 2018.

MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine semen. **Theriogenology**, v.70, p.463-468, 2008.

MOREIRA, Jane Prado Leite. **Efeito da auto-hemoterapia menor, auto-hemoterapia menor ozonizada e insuflação retal de ozônio sobre parâmetros hematimétricos e bioquímicos de cães hípidos**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 64 f., 2015.

MORRIS, L. H., HUNTER, R. H., ALLEN, W.R. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p. 95-100, 2000.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B.M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, p.230-238, 2005.

NERY, I.H.A.V.; ARAÚJO SILVA, R.A.J.; SOUZA, H.M.; ARRUDA, L.C.P.; MONTEIRO, M.M.; SEAL, D.C.M.; SILVA, G. R.; SILVA, T. M. S.; CARNEIRO, G.F.; BATISTA, A. M.; CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Effects of l-Carnitine on Equine Semen Quality During Liquid Storage. **Biopreservation and Biobanking**, v. 18, n. 5, p. 403-408, 2020.

NOGUEIRA, B.G.; BITENCOURT, J.L.; SAMPAIO, B.F.B.; BENDER, E.S.C.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, v. 15 p. 1-15, 2013.

OLIVEIRA, F. J. G.; PINHO, R. O.; MARTINS, L. F.; BORGES, M. C. B.; CARVALHO, G.R.; GUIMARÃES, J.D. Efeito da adição de glicerol em diferentes etapas do resfriamento na congelabilidade do sêmen equino. **Revista Científica De Medicina Veterinária - XIV**, n. 29, 2017.

OLIVEIRA, G.C.; OLIVEIRA, B.M.M.; ARRUDA, R.P.; ZAFFALON, F.G.; NASCIMENTO, J.; FERNANDES, C.B.; CELEGHINI, E.C.C. Características espermáticas do sêmen equino congelado com diferentes crioprotetores. In: Conferência Anual da ABRAVEQ, 9, 2010, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo, SP: ABRAVEQ, v.29, p.304-305, 2010.

OLIVEIRA, G.C.; OLIVEIRA, B.M.M.; CELEGHINI, E.C.C.; FERNANDES, C.B.; MATTOS, C.B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, jan./mar. 2013.

OLIVEIRA, T.; BUENO, V.; FINGER, I.; NUNES M. Efeito de diferentes temperaturas de descongelamento na motilidade progressiva de sêmen equino criopreservado. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.43, n.2, p.562, abr./jun. 2019.

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

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: Mckinnon AO, Voss JL (Ed.). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.769-789.

PINTO, L. A. B. **COMERCIALIZAÇÃO DE EQUINOS VIVOS NA MESORREGIÃO DO AGRESTE PARAIBANO** – Monografia (Graduação) – Departamento de Zootecnia. Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB, 28 f., 2019.

PUGLIESI, G.; DE CARVALHO, G.R.; RATES, D.M.; KER, P.G.; DA MATTA, M.P.; OLIVEIRA, R.R.; FILHO, J.M.S. 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, 2012.

REIS, R.W.; PINTO, V.; AREND, T.C.; MALSCHTZKY, E.; PIPER, M. Ozonioterapia no tratamento para pitiose em equinos. **XVII fórum de pesquisa científica e tecnológica**. Universidade Luterana do Brasil, 2018.

RIFA, D. E.; MUSA, Q. J. V. Ozonoterapia intraarticular en la enfermedad artrósica de rodilla. **Revista Cubana de Ortopedia y Traumatología**, Havana, v. 19, n. 1, 2005.

SAGAI, M.; BOCCI, B. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? **Medical Gas Research**, v. 1, n. 29, p. 18, 2011.

SALEH, R.A.; HCLD, ASHOK AGARWAL. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

SANCHEZ, C.M.S. **Utilização do óleo ozonizado para tratamento tópico de lesões em porquinho da índia (cavia porcellus)**. 2008. 38 f. – Monografia (Especialização) Clínica médica e cirúrgica de animais selvagens. Universidade Castelo Branco, Atibaia, SP, 38 f., 2008.

SANTOS, B.F.; TONGU, E. A.; SEGABINAZZI, L. G.; SCHEEREN, V. F. C.; CAVALERO, T. M. S.; NOVELLO, G.; JOAQUIM, J. G. F.; PAPA, F. O. Influência da ozonioterapia na cinética do sêmen equino fresco e refrigerado. In: Conferência Anual da ABRAVEQ, 2018, Campos do Jordão, SP. **Anais...** p. 113 – 114, 2018.

SANTOS, M.A., GRADELA, A., MORAES, E.A., SOUZA, W.L., ALVES, N.G., COSTA, J.M.S., MATOS, W.C.G. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.11, p.925-932, 2015.

SEVERO, P. C.; MÜLLER, F.; CARVALHO, J. S. M. Ozonioterapia: Suas diversas aplicações clínicas e perspectivas para o tratamento da úlcera venosa. **Anais do Seminário de Tecnologias Aplicadas em Educação e Saúde**. 2019. Disponível em: <<https://www.revistas.uneb.br/index.php/staes/article/view/8233>>. Acesso em: 20 de maio de 2021.

SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.107, p.143-9, 2012.

SILVA, C.S.; RODRIGUES, W.B.; POTIENS, J.R. SILVA, J. C. B.; ROSSIGNOLO, E. A. de A.; BARBOSA, F. B.; SILVA, E. V. da C. e.; NOGUEIRA, E. Qualidade do sêmen criopreservado e fertilidade de fêmeas bovinas em programas de IATF. In: REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANDROLOGIA ANIMAL, 2, 2017, Goiânia. **Anais... ABRAA**, p.171-174, 2017.

SILVA, S. B.; LUVIELMO, M. M.; GEYER, M. C.; PRÁ, I. Potencialidades do uso do ozônio no processamento de alimentos. **Ciências Agrárias**, v.32, p.659-682, 2011.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**. v. 65, p.958-978, 2006.

SMITH, N.L.; WILSON, A.L.; GANDHI, J.; VATSIA, S.; KHAN, S.A. Ozone therapy: an overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. **Medical Gas Research**, v. 7, n.3, p. 212-219, 2017.

SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 56-64, 2007.

SOARES, M.M. **Influência da kisspeptina na etapa de seleção espermática para a produção in vitro de embriões bovinos**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, MG, 72 f., 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.07, p. 657-664, 2016.

STORNELLI, M.C.; TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A.; STORNELLI, M.A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinária**, v.25, n.2, p.28-35, 2005.

TAPIA, A. S.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. La ozonoterapia y su fundamentación científica. **Revista Española De Ozonoterapia**, v.2, p.163-198, 2012.

THÉRIEN I; DLEAU G; MANJUNATH P. Phosphatidylcholine - binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biology of Reproduction**, v.52, p.1372-1379, 1995.

TÖPFER-PETERSEN E.; EKHLASI-HUNDRIESER M.; KIRCHOFF C; LEEB T; SIEME H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-170, 2005.

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

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

VIGLINO, G.C. Ozonioterapia Aplicada a Equinos. Vale do Paraíba: **Associação Brasileira de Ozonioterapia**, p.6, 2008.

VILARINDO, M. C.; ANDREAZZI, M. A.; FERNANDES, V. S. Considerações Sobre O Uso Da Ozonioterapia Na Clínica Veterinária. **Anais... UNICESUMAR**, v. VIII EPCC, p. 1-9, 2013.

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

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neill, J.D. **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York, p. 189-317, 1994.

YIMER, N., KAKA, A., YUSOFF, R., HARON, A.W. The Roles of Antioxidants and Fatty Acids in Sperm Cryopreservation. Cryopreservation in Eukaryotes, **IntechOpen**, v.7, p.103-120, 2016.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v.55, p.922-926, 2000.

ZIMMERMANN, M. F.; FARINASSO, A.; MELO, C. M.; PAPA, F. O.; NEVES, J. P. Sobrevida das células espermáticas equinas criopreservadas após descongelamento e diluição utilizando-se dois diluentes comerciais. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 238-245, jan./mar. 2009.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos (média $\pm$ desvio padrão) de sêmen equino criopreservado com meio de congelação BotuCRIO® (GC = controle) e BotuCRIO® acrescido de ozônio (6, 8 e 12 μg de O_3/mL), avaliados nos momentos 0, 30 e 60 minutos pós descongelção.

		Controle	6 μg O_3/mL	8 μg O_3/mL	12 μg O_3/mL
MT (%)	0h	64,21 $\pm$ 16,23 ^x	67,13 $\pm$ 17,27 ^x	61,46 $\pm$ 16,23 ^x	60,40 $\pm$ 17,74 ^x
	30 min	56,99 $\pm$ 16,37 ^{xy}	57,98 $\pm$ 15,21 ^y	57,98 $\pm$ 18,51 ^{xy}	51,00 $\pm$ 18,00 ^y
	60 min	51,68 $\pm$ 19,30 ^y	50,97 $\pm$ 16,37 ^y	55,65 $\pm$ 19,67 ^y	52,98 $\pm$ 19,77 ^{xy}
MP (%)	0h	30,30 $\pm$ 8,78 ^x	31,03 $\pm$ 9,61 ^x	27,88 $\pm$ 10,00 ^x	26,68 $\pm$ 9,50 ^x
	30 min	24,45 $\pm$ 8,35 ^{ab,y}	27,58 $\pm$ 10,33 ^{a,y}	24,90 $\pm$ 10,43 ^{ab,xy}	21,17 $\pm$ 11,02 ^{b,y}
	60 min	21,25 $\pm$ 9,67 ^y	21,93 $\pm$ 9,85 ^y	21,78 $\pm$ 10,84 ^y	19,48 $\pm$ 9,44 ^y
VCL ($\mu\text{m/s}$)	0h	84,95 $\pm$ 15,86 ^x	84,57 $\pm$ 15,11 ^x	80,50 $\pm$ 15,65 ^x	78,32 $\pm$ 16,00 ^x
	30 min	76,06 $\pm$ 15,31 ^{ab,y}	79,81 $\pm$ 15,65 ^{a,xy}	73,83 $\pm$ 14,59 ^{ab,xy}	69,03 $\pm$ 16,72 ^{b,xy}
	60 min	72,33 $\pm$ 15,90 ^{a,y}	71,13 $\pm$ 17,12 ^{a,y}	67,21 $\pm$ 16,82 ^{ab,y}	62,93 $\pm$ 16,89 ^{b,y}
VSL ($\mu\text{m/s}$)	0h	48,33 $\pm$ 8,32 ^x	48,14 $\pm$ 8,06 ^x	45,34 $\pm$ 8,36 ^x	44,47 $\pm$ 7,76 ^x
	30 min	42,85 $\pm$ 6,75 ^{ab,xy}	46,93 $\pm$ 8,68 ^{a,y}	42,42 $\pm$ 8,53 ^{ab,xy}	39,64 $\pm$ 9,31 ^{b, xy}
	60 min	40,32 $\pm$ 7,32 ^{ab,y}	41,40 $\pm$ 9,18 ^{a,y}	38,39 $\pm$ 9,17 ^{ab,y}	35,65 $\pm$ 7,68 ^{b,y}
VAP ($\mu\text{m/s}$)	0h	62,71 $\pm$ 11,41 ^x	62,45 $\pm$ 10,47 ^{xy}	59,00 $\pm$ 10,86 ^x	57,86 $\pm$ 10,65 ^x
	30 min	56,50 $\pm$ 10,57 ^{ab,xy}	60,43 $\pm$ 11,44 ^{a,x}	55,34 $\pm$ 10,61 ^{ab,xy}	51,75 $\pm$ 12,44 ^{b,xy}
	60 min	53,65 $\pm$ 11,40 ^{a,y}	53,58 $\pm$ 12,21 ^{a,y}	50,36 $\pm$ 12,32 ^{ab,y}	46,65 $\pm$ 11,28 ^{b,y}
LIN (%)	0h	57,43 $\pm$ 7,65	57,43 $\pm$ 6,40	56,77 $\pm$ 6,09	57,46 $\pm$ 6,13
	30 min	57,18 $\pm$ 6,50	59,20 $\pm$ 4,71	57,63 $\pm$ 4,38	57,70 $\pm$ 6,44
	60 min	56,31 $\pm$ 4,81	58,64 $\pm$ 6,15	57,38 $\pm$ 9,38	57,42 $\pm$ 7,12
STR (%)	0h	77,28 $\pm$ 4,95	77,27 $\pm$ 4,57	76,98 $\pm$ 4,35	77,15 $\pm$ 4,25
	30 min	76,46 $\pm$ 5,66	77,89 $\pm$ 3,43	76,72 $\pm$ 3,48	76,76 $\pm$ 5,09
	60 min	75,85 $\pm$ 5,52	77,54 $\pm$ 5,11	76,12 $\pm$ 6,79	76,84 $\pm$ 6,17
WOB (%)	0h	74,18 $\pm$ 6,77	74,22 $\pm$ 5,41	73,65 $\pm$ 5,25	74,40 $\pm$ 5,63
	30 min	74,70 $\pm$ 5,62	75,96 $\pm$ 4,73	75,12 $\pm$ 4,42	75,03 $\pm$ 4,95
	60 min	74,29 $\pm$ 4,02	75,54 $\pm$ 4,80	74,90 $\pm$ 7,73	74,52 $\pm$ 4,67
ALH (μm)	0h	2,97 $\pm$ 0,53	2,98 $\pm$ 0,53	2,95 $\pm$ 0,45	2,90 $\pm$ 0,51
	30 min	2,85 $\pm$ 0,45	2,78 $\pm$ 0,46	2,74 $\pm$ 0,48	2,65 $\pm$ 0,54
	60 min	2,66 $\pm$ 0,58	2,59 $\pm$ 0,71	2,52 $\pm$ 0,69	2,57 $\pm$ 0,67
BCF (Hz)	0h	11,32 $\pm$ 1,43	11,26 $\pm$ 1,57	11,17 $\pm$ 1,32	10,95 $\pm$ 1,39
	30 min	10,90 $\pm$ 1,08	11,32 $\pm$ 1,31	10,53 $\pm$ 1,39	10,31 $\pm$ 1,99
	60 min	10,54 $\pm$ 1,75	10,32 $\pm$ 2,50	10,10 $\pm$ 2,41	10,28 $\pm$ 2,52

MT: Motilidade total; MP: motilidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea, trajetória; VSL: velocidade em linha reta; VAP: velocidade média da trajetória; LIN: linearidade; STR: retilinearidade; WOB: índice de oscilação; ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça e BCF: frequência de batimento cruzado.

^{ab} Letras minúsculas na mesma linha representam diferença entre tratamentos ($p < 0,05$).

^{xy} Letras minúsculas na mesma coluna representam diferença entre tempos ($p < 0,05$).

Tabela 2. Integridades de membrana plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial (média $\pm$ desvio padrão) mensurados por microscopia de epifluorescência de sêmen equino criopreservado com meio de congelamento BotuCRIO® (GC = controle) e BotuCRIO® acrescido de ozônio (6, 8 e 12 μg de O_3/mL), avaliados nos momentos 0, 30 e 60 minutos pós descongelação.

		Controle	6 μg O_3/mL	8 μg O_3/mL	12 μg O_3/mL
IMP (%)	0h	40,13 $\pm$ 13,94 ^x	43,85 $\pm$ 14,06 ^x	43,77 $\pm$ 12,67 ^x	39,98 $\pm$ 13,43 ^x
	30 min	32,90 $\pm$ 11,91 ^y	36,10 $\pm$ 9,93 ^{xy}	38,19 $\pm$ 11,74 ^y	33,31 $\pm$ 9,66 ^{xy}
	60 min	26,85 $\pm$ 8,18 ^y	30,33 $\pm$ 9,51 ^y	30,38 $\pm$ 7,93 ^z	28,31 $\pm$ 8,48 ^y
PMM (%)	0h	47,27 $\pm$ 14,77 ^{a,x}	42,19 $\pm$ 14,23 ^{ab,xy}	36,50 $\pm$ 15,01 ^{bc, x}	29,49 $\pm$ 14,56 ^c
	30 min	36,41 $\pm$ 15,71 ^{a,y}	33,14 $\pm$ 17,39 ^{ab,x}	30,96 $\pm$ 15,40 ^{ab}	23,87 $\pm$ 13,19 ^b
	60 min	26,22 $\pm$ 17,53 ^z	23,96 $\pm$ 15,36 ^y	23,43 $\pm$ 17,58 ^y	16,36 $\pm$ 12,91
iAC (%)	0h	25,46 $\pm$ 23,09	25,54 $\pm$ 26,16	23,00 $\pm$ 19,72	24,67 $\pm$ 24,19
	30 min	20,58 $\pm$ 19,99	22,71 $\pm$ 22,35	23,67 $\pm$ 23,53	19,46 $\pm$ 22,77
	60 min	18,92 $\pm$ 17,29	21,04 $\pm$ 20,09	20,46 $\pm$ 15,77	17,21 $\pm$ 15,90

IMP: Integridade de membrana plasmática; PMM: potencial de membrana mitocondrial e iAC: integridade de acrossoma.

^{abc} Letras minúsculas na mesma linha representam diferença entre tratamentos ($p < 0,05$).

^{xyz} Letras minúsculas na mesma coluna representam diferença entre tempos ($p < 0,05$).

APÊNDICE A – MANUSCRITO SUBMETIDO

O artigo científico foi elaborado de acordo com as normas da Revista Animal
Reproduction (Anexo A).

Type: Applied Research Article

Running Title: Effect of ozone under stallion sperm cells

Addition of ozone gas to the equine semen extender subjected to freezing: effect on the viability of the sperm cells

Iara Nóbrega Macêdo^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-4111-0260>, Lucia Cristina Pereira Arruda² <https://orcid.org/0000-0002-5732-9777>, Breno Barros De Santana³ <https://orcid.org/0000-0001-8121-5270>, Thalles Cloves Maciel de Moura² <https://orcid.org/0000-0003-3911-4550>, Maria Madalena Pessoa Guerra² <https://orcid.org/0000-0002-5373-4062>, Diogo Gutemberg Bezerra³ <https://orcid.org/0000-0002-2900-3278>, Gustavo Ferrer Carneiro² <https://orcid.org/0000-0002-9466-9500>, Sildivane Valcácia Silva¹ <https://orcid.org/0000-0003-1488-8074>.

¹ Universidade Federal da Paraíba, Departamento de Medicina Veterinária, Areia, PB, Brasil

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, PE, Brasil

³ Central Monte Verde de Reprodução Equina, Sairé, PE, Brasil

* Correspondence: Iara Nóbrega Macêdo, iaranmacedo@gmail.com, 58102-322: R. Capitão Eumenes Gonçalves Martins, 298, apt 101, Intermars, Cabedelo – PB.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of the addition of different concentrations of ozone to the semen of quarter horse submitted to cryopreservation. Six ejaculates from four stallions (n=24) were collected. Those were divided and added to four experimental groups: control group composed of the freezing extender (BotuCRIO®) and three other groups with freezing extenders (BotuCRIO®) ozonized at concentrations of 6, 8 and 12 μg of O_3/mL . The semen samples were diluted (200×10^6 spermatozoa/mL), filled in reeds and frozen. After thawing (37°C , 30s), the samples were evaluated at moments 0, 30 and 60 minutes of incubation regarding sperm kinetics, plasma membrane integrity (PMI), acrossome integrity (ACi) and mitochondrial membrane potential (MMP). Kinetic parameters were evaluated using the computerized system of sperm analysis (CASA), cellular integrity tests were performed under epifluorescence microscopy through the use of fluorescent probes. There was a reduction in kinetic parameters (MT, MP, VCL, VSL and VAP) in all groups during the thermoresistance test (TT), a pattern also found in PMI and MMP analyses ($p < 0.05$). For the kinetic parameters of MT, LIN, STR, WOB, ALH and BCF there was no difference ($p > 0.05$) between the control and the treatments (6, 8 and 12 μg of O_3/mL), in any of the evaluated times. Regarding the parameters VCL, VSL and VAP, the group treated with 6 μg did not differ from the control or from 8 μg , but was higher than 12 μg at 30 and 60 minutes. ACi and PMI did not differ between groups ($p > 0.05$) and PMI was lower in groups 8 μg and 12 μg compared to control and 6 μg ($p < 0.05$). It is concluded that the addition of ozone does not present beneficial effects for cryopreservation of equine semen at the concentrations used and decreases important parameters for fertility.

Keywords: antioxidants, cryopreservation, ozone therapy, spermatozoa, stallion sperm.

Introduction

Equideoculture has occupied a prominent position in Brazil and has been responsible for moving the country's economy. According to data from ANUALPEC, in 2019 Brazil has had a total of approximately 5,501,872 million horses.

With the impulse of this sector in agribusiness, it was necessary to enable techniques that could promote the genetic improvement of animals (BRANDÃO, 2008).

One of the biotechniques with the greatest impact on the market is artificial insemination (AI), an effective tool to accelerate genetic gain and crossing without geographical barriers being considered a limitation (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Artificial insemination associated with cryopreservation of semen represents an important resource in the preservation of equine species, both by attempting to maximize fertility and by the use of genetic higher stallions. It allows the formation of a genetic bank available at any time for animals of high racial and commercial standards (YIMER *et al.*, 2016) and the possibility of a stallion obtaining hundreds of descendants over times (CANISSO *et al.*, 2008).

Although numerous studies are constantly being developed and demonstrate great advantages in its use, the frozen semen of stallions still presents variable fertility results (SANTOS *et al.*, 2015). Studies indicate that one of the important factors that occur is that cryopreservation increases the production of reactive oxygen species (ROS) by spermatozoa (LUCIO *et al.*, 2016) and decreases antioxidant defenses present in semen (MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2012).

1 With the objective of reducing oxidative damage caused due to the action of
2 ROS, which can influence the sperm function and imbalance between production and
3 degradation (BANSAL; BILASPURI, 2011), researchers have added antioxidants to
4 freezing extenders in order to improve post-defrosting sperm viability (LI *et al.*, 2017).

5 Ozone (O₃) is considered to be a potent oxidizing agent (INAL *et al.*, 2011),
6 capable of promoting oxidative stress, and at the same time, induce resistance to this
7 stress, stimulating the response of the antioxidant system (MANOTO *et al.*, 2018).

8 Ozone is produced by medical generator, through the connection with an oxygen
9 cylinder, where due to a high voltage gradient, oxygen (O₂) is converted into ozone
10 (O₃). It is a gas with high instability and short half-life, which, its action time is no more
11 than 40 min at 20 °C (SMITH *et al.*, 2017).

12 Reliable, inexpensive, practical and with few adverse effects reported, O₃ has
13 become a highly promising alternative, with important advantages for several types of
14 patients (SEVERO, 2019), since the systemic level offers a number of benefits with its
15 bactericidal, anti-inflammatory, hemodynamic and analgesic functions (DE ANDRADE
16 *et al.*, 2019). It has been featured in the treatment of many pathologies, being widely
17 used in human medicine, but has also aroused interest in veterinary medicine due to its
18 power of oxidative destruction (GREENE *et al.*, 1993; HERNÁNDEZ; GONZÁLEZ,
19 2001).

20 Several antioxidant substances have already been used in equine semen,
21 however, despite being on the rise in human medicine and in the wide development in
22 veterinary medicine, especially in this species, ozone still does not have significant
23 studies that prove its safety and efficacy regarding effects as a stallion semen
24 antioxidant.

Materials and Methods

Animals

Ejaculates of four quarter-horse stallions, aged between six and twenty-three years old, submitted to the same management (stabled animals, being provided 3.0 kg/animal/day of concentrate, tifton hay and water *ad libitum*), clinically healthy, with historic of fertility and submitted to andrological examination.

Semen Collection and Analysis

Six ejaculates were collected from each stallion, totaling 24 ejaculates, harvests were performed every other day, the ejaculates were obtained through the artificial vagina method (Botucatu model), with the aid of a mannequin. In the artificial vagina was coupled a collector cup composed of a plastic condom and nylon filter for the removal of the gel fraction.

The ejaculates were immediately evaluated after harvest (CBRA, 2013), macroscopic (volume, color, appearance and odor) and microscopic analyses (motility and sperm vigor) were performed using the computerized analysis method (Mace Sperm Tracker – Anturius, Brazil) with a camera coupled to an optical microscope (BEL Tech Bio 2, BEL Engineering®, Italy), during the evaluation of the samples were kept in a heating plate at 37 °C. The sperm concentration was determined by the Neubauer chamber, using ratio (1:20) in distilled water, under optical microscopy in an increase of 40x (BEL Tech Bio 2, BEL Engineering®, Italy).

Dilution and Treatments

The ejaculate of each equine was diluted, in a ratio of 1:1, in a commercial extender based on skimmed milk (BotuSemen®, Botupharma, Brazil), submitted to centrifugation (600 x g, for 10 minutes) for removal of seminal plasma. After centrifugation, the supernatant was removed and the pellet was resuspended in a commercial egg yolk extender (BotuCRIO®, Botupharma, Brazil), at the concentration of (200 x 10⁶ spermatozoa/mL). According to the experimental group, the BotuCRIO® thinner was ozonized through an oxygen converter device in ozone gas (Portable O&L Model, Ozone & Life® - São José dos Campos - Brazil) in a ratio of 1:1 in ozone volume and diluent volume, homogenized in a syringe.

Each ejaculation, after being centrifuged, was divided and added into four groups: control group (CG, BotuCRIO ®, without adding ozone gas), group I (BotuCRIO® commercial medium, ozonized with 6 µg of O₃/mL), group II (BotuCRIO®, ozonized with 8 µg of O₃/mL) and group III (BotuCRIO commercial®, ozonized with 12 µg Of O₃/mL). Then, the samples were filled in vanes (0.5 mL), duly identified, sealed with polyvinyl alcohol and submitted to cryopreservation.

Cryopreservation

The cryopreservation process was carried out in programmable freezing machine (TK 3000 CSE, TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, MG, Brazil). Initially, semen straws, at room temperature (28 °C), they were subjected to the cooling curve (-0.5 °C/min) until reaching 5 °C, and maintained at this temperature for 20 minutes (stabilization period). After this cooling period, the samples were submitted to the

freezing curve (-15 °C/min) until reaching the temperature of -120 °C, then they were immersed in liquid nitrogen and stored in cryogenic cylinders at -196 °C.

Thawing and Semen Analysis

At the time of analysis, two vanes from each experimental group were removed from cryogenic canisters and thawed in water bath at 37 °C/30 seconds. After that, they were submitted to the thermoresistance test (TT), considering M0= immediately post-thawing, M30= 30 minutes after thawing and incubation (37 °C) and M60= after 60 minutes of thawing and incubation (37 °C). At each time, the sperm kinetics, plasma membrane integrity, acrosome integrity and mitochondrial membrane potential were evaluated.

Sperm kinetics

The following variables were analyzed through the computerized system of sperm analysis (CASA; SCATM, Microptics, S.L. Version 5.1, Barcelona, Spain): total motility (TM; %), progressive motility (PM; %), straight line velocity (VSL; µm/s), curvilinear velocity (VCL; µm/s), average path velocity (VAP; µm/s), beat cross frequency (BCF; Hz), amplitude of lateral head displacement (ALH; µm), straightness (STR; %), linearity (LIN; %) and wobble index (WOB, %).

Aliquots of each sample (2.5 µL) of semen were evaluated individually on a slide covered with cover glass (18 x 18 mm), preheated at 37 °C, and examined under a phase contrast microscope (100x, Eclipse 50i, Nikon, Japan), with a 10x objective, coupled to the CASA system. At least 500 sperm were captured per sample, in five random, non-consecutive fields selected by the same operator.

The parameters of the CASA system were adjusted according to Nery *et al.* (2020), with the following settings: temperature of 37 °C; magnification 100 x; number of images per second 24; head area, 10-70 μm^2 ; VAP: 10 $\mu\text{m/s}$ slow; <45 $\mu\text{m/s}$ medium; <90 $\mu\text{m/s}$ fast; progressivity 75% STR; circular 50% LIN.

Cellular health tests

The plasma membrane integrity tests and acrosome integrity, as well as the mitochondrial activity, were performed using fluorescent probes in epifluorescence microscopy (Axiostar plus, Zeiss, Germany), two hundred sperm cells were counted by slide, with a magnification of 40x for plasma membrane and mitochondria and 100x for acrosome and were classified based on the fluorescence emitted from each probe (ARAÚJO SILVA *et al.*, 2019).

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fluorophore stock solutions were prepared as follows: propidium iodide (PI, 25 mg /mL), JC-1 (5 mg /mL) and FITC conjugated with Peanut agglutinin (FITC-PNA, 1 mg /mL) in Phosphate buffered saline (PBS); The working solutions were JC-1 (153 μM) dimethyl sulfoxide (DMSO), FITC-PNA (0.04 mg/mL) and PI (0.5 mg/mL) in PBS and carboxyfluorescein diacetate (CFDA; 0.46 mg/mL in DMSO). All solutions were maintained at -20° C until use.

Previously, plasma membrane integrity (PMI) and mitochondrial activity potential (MMP) analyses were diluted 200 μL of semen in TRIS-wash buffer (500 μL), centrifuged (100xg/5min) and resuspended in TRIS (60 μL), then 30 μL were separated for evaluation of PMI and 30 μL for MMP.

Plasma membrane integrity (PMI) was evaluated by the double staining method of propidium iodide fluorophores (PI) and carboxyfluorescein diacetate (CFDA), detected by the inclusion of PI in the cell nucleus. A sample aliquot (30 μ L) was stained with 5.0 μ L of CFDA and 5.0 μ L of PI and incubated for a period of 10 min at 25 °C. Sperm were evaluated using DBP excitation filters 485/20 nm and DBP 580-630 nm. Spermatozoa stained in green were considered intact and those that were stained in red were considered to have damaged membrane.

The mitochondrial activity potential (MMP) was evaluated using a lipophilic cationic fluorophore (JC-1). The sample aliquot (30 μ L) was stained with 5.0 μ L of JC-1 and incubated for 10 min at 25 °C. Sperm were evaluated using BP 450-490 nm excitation and LP 515 emission filters. Spermatozoa with an intermediate part stained in orange were considered to have a high MMP, while sperm with green intermediate part were considered to have a low MMP.

The integrity assessment of acrosome (ACi) was performed by Fluorescein Isothiocyanate conjugated to Peanut agglutinin (FITC-PNA). An aliquot (10 μ L) of the sample was used to make a smear, air-dried. The slides were stained with aliquots of 20 μ L of FITC-PNA and incubated in a humid chamber at 4 °C for 15 min in the absence of light. Then, slides were immersed in PBS twice and dried in the air. Immediately before evaluation, 5.0 μ L of UCD solution (4.5 mL of glycerol, 0.5 mL of PBS and 5.0 mg of p-phenylenediamine) were placed on the slide and covered with a cover glass. Sperm were evaluated using a BP 450-490 nm excitation filter and LP 515 nm emission. The acrosome of sperm stained with fluorescent green were considered to have an intact acrosome. When only the equatorial region of the sperm head was fluorescent green or when fluorescence was absent, sperms were considered to have a damaged acrosome.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using the GraphPad InStat Software (version 3.10, 2009). The variables expressed in percentage were transformed by sine arc ($\text{sine arc } \sqrt{P/100}$). The data was initially submitted to a normality test (Kolmogorov-Sminorv), to identify the distribution of data and choose parametric or nonparametric tests. After identification, the data was submitted to variance analysis (ANOVA), followed by tukey's post-test, if parametric, or Kruskall-Walis, if non-parametric. All tests described were performed with at least 5% confidence level ($p < 0.05$).

Before direct experimentation with the animals, the project was submitted and approved by the Ethics Commission on the Use of Animals (CEUA/UFPB) under the protocol number 4277190820. The animals were from the Central Monte Verde de Reprodução Equina, located in Sairé, Pernambuco, Brazil (latitude: 8° 19' 42" South, longitude: 35° 41' 23" West). Semen samples were obtained in March and April of 2021.

Results

The kinetics' results of frozen equine semen with different concentrations of ozone are presented in Table 1, where it can be observed that for the parameters of TM, LIN, STR, WOB, ALH and BCF there was no significant difference ($p > 0.05$) between the control group and the treatments (6, 8 and 12 μg of O_3/mL), in any of the evaluated times.

For VCL, VSL and VAP, there was no significant effect ($p>0.05$) between the experimental groups at 0h. At 30 min, for the three parameters, the group treated with 6 μg of O_3/mL was higher ($p<0.05$) than 12 μg O_3/mL and did not differ ($p>0.05$) from the control and 8 μg from O_3/mL . At 1h of incubation, VCL and VAP of the control groups and 6 μg of O_3/mL , were higher ($p<0.05$) than that of 12 μg of O_3/mL and did not differ ($p>0.05$) from 8 μg of O_3/mL . For VSL, at 1h, the 6 μg of O_3/mL was higher ($p<0.05$) than 12 μg of O_3/mL and did not differ ($p>0.05$) from the control and 8 μg of O_3/mL .

Regarding the evaluation of the complete incubation time, it can be observed that for the parameters of TM, PM, VCL, VSL and VAP, there was a reduction ($p<0.05$) in all groups studied.

The results of plasma membrane integrity, acrosome integrity and mitochondrial membrane potential are shown in Table 2. There was no increase ($p>0.05$) in the percentage of cells with intact plasma membrane and acrosome with the treatment of stallions sperm with O_3 , at all times evaluated. For MMP there was a reduction ($p<0.05$) in the number of cells presenting high MMP. At 0h there was a reduction ($p<0.05$) in the groups treated with 8 μg of O_3/mL and 12 μg of O_3/mL , when compared to the control group, with 12 μg of O_3/mL also lower ($p<0.05$) at 6 μg of O_3/mL . At 30 minutes the 12 μg of O_3/mL was also lower ($p<0.05$) to the control group and after 60 minutes there was no difference ($p>0.05$) between the groups.

In the evaluation between times, for these parameters, there was a reduction ($p<0.05$) in the percentage of cells with integrated plasma membrane and with high MMP over time for all groups. The percentage of cells with intact acrosomes remained ($p>0.05$) throughout the incubation period in all groups.

Discussion

In the present study, the effect of adding O₃ to the cryopreservation diluent of equine semen under kinetics, plasma membrane integrity, acrosome integrity and mitochondrial membrane potential immediately after thawing and for 30 and 60 minutes of incubation at 37 °C was evaluated. The thermoresistance test (TT) was performed because it offers greater reliability in the measurement of parameters and indicators of fertility of sperm *in vitro* (FOSTER *et al.*, 2011) and aims to simulate the permanence of sperm in the female's genital tract (ARRUDA *et al.*, 1992).

With this, it can be observed that there was a reduction in the parameters of TM, PM, VCL, VSL and VAP in all groups throughout the thermoresistance test (TT), a pattern also found in the PMI and MMP analyses. Several authors are adding in their studies the use of TT to observe the longevity of post-thawing cells. Fürst *et al.* (2005), for example, also evaluated the longevity of thawed equine semen and observed, regardless of the protocol, that there was a decrease in sperm motility along the TT, as observed in the present study. One decrease in PMI after TT may be justified by the damage caused to the structures and organelles involved in the sperm movement during the freezing/thawing process (WATSON, 1995, *apud* SANTOS *et al.*, 2015).

Kinetic analyses also revealed no benefits in ozonizing the freezing extender in relation to the parameters of TM, LIN, STR, WOB, ALH and BCF, which remained similarly preserved in all groups and times. These results complement the reports of Santos *et al.* (2018), that, when ozonizing the extender with 8 mg of O₃/L and added to

1 fresh and chilled semen, did not observe differences in the percentages of TM, PM and
2 showed intact plasma membrane in the two moments evaluated.

3 As for the values found for the velocities, it was observed that there is a negative
4 correlation between a higher concentration of O₃ and the velocities of VCL, VSL and
5 VAP, while lower concentrations were similar to the control action. These are important
6 parameters in fertilization rates (Silva *et al.*, 2017).

7 The concentration of 12 µg Of O₃/mL may have caused toxicity to the sperm
8 cell. Sagai and Bocci (2011) stated that doses of 10 to 80 µg/mL are considered safe for
9 fluids, but there are few reports in the literature about ozone addition on semen, in this
10 case, insufficient data implies that safe doses and its use still have to be discussed.

11 PMI was not affected by added ozone in relation to the control group and
12 treatments, which corroborates with the studies by Santos *et al.* (2018), who
13 demonstrated that adding semen to the ozoned extender did not alter the percentages of
14 intact plasma membrane. The ACi was also not influenced by the treatments. According
15 to Watson *et al.* (1987) *apud* Soares (2018), in the head region of the sperm, in order to
16 show an injury of the acrosome, it is necessary that the plasma membrane is also
17 injured, considering that is the outermost membrane and an extra protection for the
18 acrosome, which confirms the results previously in PMI and ACi, the integrity of one
19 depends on the integrity of the other. These are essential factors for maintaining sperm
20 metabolism, capacitation and acrosome reaction. The fertilization only happens if the
21 acrosome is intact (SILVA; GADELLA, 2006).

22 In relation to MMP, there was a reduction of cells with high MMP and this
23 occurred in treatments with higher concentrations of O₃ in relation to the control group
24 (8 and 12 µg of O₃/mL). As we know, mitochondria are essential in sperm physiology

1 and have its energy production generated by ATP synthesis, preceding oxidative
2 phosphorylation, this enables sperm movement (CÂMARA; GUERRA, 2008).

3 With the reduction of MMP, it is noticeable that higher concentrations of ozone
4 act directly in the mitochondria in a negative way, probably causing damage through
5 increased production of free radicals and ROS, leading to mitochondrial damage, with a
6 reduction in ATP synthesis, change in linear trajectory and speed reduction and this all
7 occurs without increasing the proportion of static spermatozoa (ORTEGA-
8 FERRUSOLA *et al.*, 2009), which would justify the alterations found in the present
9 study, such as MMP, VCL, VSL and VAP reduced in treatments with higher
10 concentrations.

11 Sperm has two sources of antioxidant defense, the enzymatic system, which has
12 limited defense capacity (ZINI *et al.*, 2000) and seminal plasma, which has extreme
13 importance in protecting the cell against harmful effects of oxidative stress (BUCCI *et*
14 *al.*, 2016); However, in this experiment, seminal plasma was removed in the
15 centrifugation process, which may explain the absence of an adequate antioxidant
16 response in the results of this study.

17 Therefore, the sperm exposed to the concentration of 6 µg of O₃/mL did not
18 present alterations different from those observed in the control group, because the
19 concentration is insufficient to trigger the cascade of therapeutic action of O₃ and above
20 6 µg of O₃/mL leads to an exacerbated oxidation and the cells cannot produce an
21 antioxidant defense capable of justifying their use in the semen.

22 23 **Conclusion** 24

Adding ozone to the equine semen freezing extender causes a reduction in kinetic parameters (VCL, VSL and VAP), has no protective effects on the integrity of plasma and acrosome membranes, and reduces the mitochondrial membrane potential of equine sperm cells submitted to cryopreservation.

Acknowledgments

The authors recognize the following institutions and people: Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural de Pernambuco and Central Monte Verde de Reprodução Equina. This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia no Estado da Paraíba – FAPESQ.

References

- ANUALPEC 2019. Anuário da pecuária brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2019. Ed. Argos, p.400.
- Araújo Silva RAJ, Batista AM; Arruda LCP, Souza HM, Nery IHAV, Gomes WA, Soares PC, Silva SV, Guerra MMP. Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat semen related with seminal plasma removal. Anim Reprod, 2019, 16(4):895–901. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0012>
- Arruda RP, Barnabe VH, Alencar MM, Barnabe RC. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. Braz. J.

Vet. Res. Anim. Sci, 1992; [Cited 2021 Jul 15] 29(1):131-137. Available from:

<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/42104>

Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. Veterinary Medicine International, 2011; 1–7.

<https://doi.org/10.4061/2011/686137> PMid: 20871827

Brandão AC. Efeitos do laser diodo sobre as características de motilidade, integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides. [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008. Portuguese.

Bucci D, Giaretta E, Spinaci M, Rizzato G, Isani G, Mislei B, Mari G, Tamanini C, Galeati G. Characterization of alkaline phosphatase activity in seminal plasma and in fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. Theriogenology, 2016; 85(2):288-295.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.007> PMid: 26433714

Câmara DR, Guerra MMP. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). Rev Bras Reprod Anim, 2008; [Cited 2021 Jul 15] 32(2): 93-99.

Available from:

<http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB162%20Camara%20pag93-99.pdf>

Canisso IF, Souza FA, Silva EC, Carvalho GR, Guimarães JD, Lima AL. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. Rev Acad Ciênc Agrár Ambient, Curitiba, 2008; 6(3):389-398. <http://dx.doi.org/10.7213/cienciaanimal.v6i3.10622>

De Andrade RR, De Oliveira-Neto OB, Barbosa LT, Santos IO, De Sousa-Rodrigues C, Barbosa FT. Effectiveness of ozone therapy compared to other therapies for low back pain: a systematic review with meta-analysis of randomized clinical trials. Rev Bras Anesthesiol, 2019; 69(5):493–501. <https://doi.org/10.1016/j.bjane.2019.06.007>

Foster ML, Love CC, Varner DD, Brinsko SP, Hinrichs K, Teague S, Lacaze K, Blanchard TL. Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes Theriogenology, 2011; 76(2):334–341. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.012> PMID: 21496902

Fürst R, Carvalho GR, Fürst COM, Ruas JRM, Borges AM, Mafilli V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. Arq Bras Med Vet Zootec, 2005; 57(5):599-607. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000500005>

Greene AK, Few BW, Serafini JC. A comparison of ozonation and chlorination for disinfection of stainless steel surfaces. J Dairy Sci, 1993; 76(11):3617-3620. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(93\)77702-4](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(93)77702-4) PMID: 8270705

Hernández OD, González RC. Ozonoterapia en úlceras flebostáticas. Rev Cuba Cir, 2001; 40(2):123-129.

Inal MA, Dokumacioglu E, Ozcelik O. U. The effects of ozone therapy and coenzyme Q(1)(0) combination on oxidative stress markers in healthy subjects. Ir J Med Sci, 2011; 180: 703-707. <https://doi.org/10.1007/s11845-011-0675-7> PMid: 21258872

Li P, Xi MD, Du H, Qiao XM, Liu ZG, Wei QW. Antioxidant supplementation, effect on post-thaw spermatozoa function in three sturgeon species. Reproduction in Domestic Animals, 2017; 53(2):287-295. <https://doi.org/10.1111/rda.13103> PMid: 29266415

Lucio CF, Regazzi FM, Silva LCG, Angrimani DSR, Nichi M, Vannucchi CI. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. Theriogenology, 2016; 85(9):1568–1575. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.016> PMid: 26879999

Manoto SL, Maepa MJ, Motaung SK. Medical ozone therapy as a potential treatment modality for regeneration of damaged articular cartilage in osteoarthritis. Saudi J Biol Sci, 2018; 25(4):672-679. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.002> PMid: 29736142

Martínez-Páramo S, Diogo P, Dinis MT, Herráez MP, Sarasquete C, Cabrita E. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. Theriogenology, 2012; 77(6):1129-1136. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.017> PMid: 22153272

Nery IHAV, Araújo Silva RAJ, Souza HM, Arruda LCP, Monteiro MM, Seal DCM, Silva GR, Silva TMS, Carneiro GF, Batista AM, Câmara DR, Guerra MMP. Effects of l-Carnitine on Equine Semen Quality During Liquid Storage. Biopreserv Biobank, 2020; 18(5):403-408. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0025> PMID: 32799560

Oliveira T, Bueno V, Finger I, Nunes M. Efeito de diferentes temperaturas de descongelamento na motilidade progressiva de sêmen equino criopreservado. Rev. Bras. Reprod. Anim., 43(2):562. 2019 [Citado 10 de jun de 2021]. Available from: [http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p562-608%20\(equinos\).pdf](http://cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/rbra/v43/n2/p562-608%20(equinos).pdf)

Ortega-Ferrusola C, González FL, Morrell JM, Salazar SC, Macías GB, Rodríguez-Martínez H, Tapia JA, Peña F.J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. Reproduction, 2009, 138(1):55-63. <https://doi.org/10.1530/rep-08-0484> PMID: 19380427

Sagai M, Bocci B. Mechanisms of action involved in ozone therapy: is healing induced via a mild oxidative stress? Med Gas Res, 2011; 1(29):18. <https://dx.doi.org/10.1186%2F2045-9912-1-29> PMID: 22185664

Santos BF, Tongu EA, Segabinazzi LG, Scheeren VFC, Cavaleiro TMS, Novello G, Joaquim JGF, Papa FO. Influência da ozonioterapia na cinética do sêmen equino fresco

1 e refrigerado. In: Conferência Anual da ABRAVEQ, 2018; 2018 May 25-27; Campos
2 do Jordão, SP. p. 113 – 114.

3
4 Santos MA, Gradela A, Moraes EA, Souza WL, Alves NG, Costa, JMS, Matos, WCG.
5 Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. Pesq
6 Vet Bras; 2015; 35(11):925-932. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015001100009>

7
8 Soares MM. Influência da kisspeptina na etapa de seleção espermática para a produção
9 in vitro de embriões bovinos. [Dissertação] Uberlândia: Universidade Federal de
10 Uberlândia, 2018.

11
12 Severo PC, Müller F, Carvalho JSM. Ozonioterapia: Suas diversas aplicações clínicas e
13 perspectivas para o tratamento da úlcera venosa. In: Seminário de Tecnologias
14 Aplicadas em Educação e Saúde; 2019 August 26-27. Salvador – BA. p. 215-225.

15
16 Silva CS, Rodrigues WB, Potiens JR, Silva JCB, Rossignolo EA De A, Barbosa FB,
17 Silva EV Da CE, Nogueira E. Qualidade do sêmen criopreservado e fertilidade de
18 fêmeas bovinas em programas de IATF. In: Reunião Da Associação Brasileira De
19 Andrologia Animal, v.2, 2017; Uberlândia, MG. p.171-174.

20
21 Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells.
22 Theriogenology, 2006; v. 65(5): 958-978.
23 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010> PMID: 16242762

1 Smith NL, Wilson AL, Gandhi J, Vatsia S, Khan SA. Ozone therapy: an overview of
2 pharmacodynamics, current research, and clinical utility. Med Gas Res, 2017; 7(3):212-
3 219. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.215752> PMid: 29152215

4
5 Yimer N, Kaka A, Yusoff R, Haron AW. The Roles of Antioxidants and Fatty Acids in
6 Sperm Cryopreservation. Cryopreservation in Eukaryotes, IntechOpen, 2016; 7:103-
7 120. <http://dx.doi.org/10.5772/65571>

8
9 Zini A, Garrels K, Phang D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile
10 men. Urology, 2000; 55(6):922-926. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(00\)00453-2](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(00)00453-2)
11 PMid: 10840

12

Table 1. Kinetic parameters (mean $\pm$ standard deviation) of equine semen cryopreserved with BotuCRIO® extender (GC = control group) and BotuCRIO® added with ozone (6, 8 and 12 μg of O_3 / mL), at 0, 30 and 60 minutes post thawing

		Control	6 μg O_3 /mL	8 μg O_3 /mL	12 μg O_3 /mL
	0h	64.21 $\pm$ 16.23 ^x	67.13 $\pm$ 17.27 ^x	61.46 $\pm$ 16.23 ^x	60.40 $\pm$ 17.74 ^x
TM	30 min	56.99 $\pm$ 16.37 ^{xy}	57.98 $\pm$ 15.21 ^y	57.98 $\pm$ 18.51 ^{xy}	51.00 $\pm$ 18.00 ^y
(%)	60 min	51.68 $\pm$ 19.30 ^y	50.97 $\pm$ 16.37 ^y	55.65 $\pm$ 19.67 ^y	52.98 $\pm$ 19.77 ^{xy}
	0h	30.30 $\pm$ 8.78 ^x	31.03 $\pm$ 9.61 ^x	27.88 $\pm$ 10.00 ^x	26.68 $\pm$ 9.50 ^x
PM	30 min	24.45 $\pm$ 8.35 ^{ab.y}	27.58 $\pm$ 10.33 ^{a.y}	24.90 $\pm$ 10.43 ^{ab.xy}	21.17 $\pm$ 11.02 ^{b.y}
(%)	60 min	21.25 $\pm$ 9.67 ^y	21.93 $\pm$ 9.85 ^y	21.78 $\pm$ 10.84 ^y	19.48 $\pm$ 9.44 ^y
	0h	84.95 $\pm$ 15.86 ^x	84.57 $\pm$ 15.11 ^x	80.50 $\pm$ 15.65 ^x	78.32 $\pm$ 16.00 ^x
VCL	30 min	76.06 $\pm$ 15.31 ^{ab.y}	79.81 $\pm$ 15.65 ^{a.xy}	73.83 $\pm$ 14.59 ^{ab.xy}	69.03 $\pm$ 16.72 ^{b.xy}
($\mu\text{m/s}$)	60 min	72.33 $\pm$ 15.90 ^{a.y}	71.13 $\pm$ 17.12 ^{a.y}	67.21 $\pm$ 16.82 ^{ab.y}	62.93 $\pm$ 16.89 ^{b.y}
	0h	48.33 $\pm$ 8.32 ^x	48.14 $\pm$ 8.06 ^x	45.34 $\pm$ 8.36 ^x	44.47 $\pm$ 7.76 ^x
VSL	30 min	42.85 $\pm$ 6.75 ^{ab.xy}	46.93 $\pm$ 8.68 ^{a.y}	42.42 $\pm$ 8.53 ^{ab.xy}	39.64 $\pm$ 9.31 ^{b.xy}
($\mu\text{m/s}$)	60 min	40.32 $\pm$ 7.32 ^{ab.y}	41.40 $\pm$ 9.18 ^{a.y}	38.39 $\pm$ 9.17 ^{ab.y}	35.65 $\pm$ 7.68 ^{b.y}
	0h	62.71 $\pm$ 11.41 ^x	62.45 $\pm$ 10.47 ^{xy}	59.00 $\pm$ 10.86 ^x	57.86 $\pm$ 10.65 ^x
VAP	30 min	56.50 $\pm$ 10.57 ^{ab.xy}	60.43 $\pm$ 11.44 ^{a.x}	55.34 $\pm$ 10.61 ^{ab.xy}	51.75 $\pm$ 12.44 ^{b.xy}
($\mu\text{m/s}$)	60 min	53.65 $\pm$ 11.40 ^{a.y}	53.58 $\pm$ 12.21 ^{a.y}	50.36 $\pm$ 12.32 ^{ab.y}	46.65 $\pm$ 11.28 ^{b.y}
	0h	57.43 $\pm$ 7.65	57.43 $\pm$ 6.40	56.77 $\pm$ 6.09	57.46 $\pm$ 6.13
LIN	30 min	57.18 $\pm$ 6.50	59.20 $\pm$ 4.71	57.63 $\pm$ 4.38	57.70 $\pm$ 6.44
(%)	60 min	56.31 $\pm$ 4.81	58.64 $\pm$ 6.15	57.38 $\pm$ 9.38	57.42 $\pm$ 7.12
	0h	77.28 $\pm$ 4.95	77.27 $\pm$ 4.57	76.98 $\pm$ 4.35	77.15 $\pm$ 4.25
STR	30 min	76.46 $\pm$ 5.66	77.89 $\pm$ 3.43	76.72 $\pm$ 3.48	76.76 $\pm$ 5.09
(%)	60 min	75.85 $\pm$ 5.52	77.54 $\pm$ 5.11	76.12 $\pm$ 6.79	76.84 $\pm$ 6.17
	0h	74.18 $\pm$ 6.77	74.22 $\pm$ 5.41	73.65 $\pm$ 5.25	74.40 $\pm$ 5.63
WOB	30 min	74.70 $\pm$ 5.62	75.96 $\pm$ 4.73	75.12 $\pm$ 4.42	75.03 $\pm$ 4.95
(%)	60 min	74.29 $\pm$ 4.02	75.54 $\pm$ 4.80	74.90 $\pm$ 7.73	74.52 $\pm$ 4.67
	0h	2.97 $\pm$ 0.53	2.98 $\pm$ 0.53	2.95 $\pm$ 0.45	2.90 $\pm$ 0.51
ALH	30 min	2.85 $\pm$ 0.45	2.78 $\pm$ 0.46	2.74 $\pm$ 0.48	2.65 $\pm$ 0.54
(μm)	60 min	2.66 $\pm$ 0.58	2.59 $\pm$ 0.71	2.52 $\pm$ 0.69	2.57 $\pm$ 0.67
	0h	11.32 $\pm$ 1.43	11.26 $\pm$ 1.57	11.17 $\pm$ 1.32	10.95 $\pm$ 1.39
BCF	30 min	10.90 $\pm$ 1.08	11.32 $\pm$ 1.31	10.53 $\pm$ 1.39	10.31 $\pm$ 1.99
(Hz)	60 min	10.54 $\pm$ 1.75	10.32 $\pm$ 2.50	10.10 $\pm$ 2.41	10.28 $\pm$ 2.52

Total motility (TM; %), progressive motility (PM; %), straight line velocity (VSL; $\mu\text{m/s}$), curvilinear velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$), average path velocity (VAP; $\mu\text{m/s}$), beat cross frequency (BCF; Hz), amplitude of lateral head displacement (ALH; μm), straightness (STR; %), linearity (LIN; %) and wobble index (WOB, %).

^{ab} Lowercase letters on the same line represent difference between treatments ($p < 0.05$).

^{xy} Lowercase letters in the same column represent time difference ($p < 0.05$).

Table 2. Plasma and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential (mean $\pm$ standard deviation) measured by epifluorescence microscopy of equine semen cryopreserved with BotuCRIO® (GC = control group) and BotuCRIO® plus ozone (6, 8 and 12 μ g of O₃/mL), evaluated at 0, 30 and 60 minutes post thawing

		Control	6 μ g O ₃ /mL	8 μ g O ₃ /mL	12 μ g O ₃ /mL
PMI (%)	0h	40.13 $\pm$ 13.94 ^x	43.85 $\pm$ 14.06 ^x	43.77 $\pm$ 12.67 ^x	39.98 $\pm$ 13.43 ^x
	30 min	32.90 $\pm$ 11.91 ^y	36.10 $\pm$ 9.93 ^{xy}	38.19 $\pm$ 11.74 ^y	33.31 $\pm$ 9.66 ^{xy}
	60 min	26.85 $\pm$ 8.18 ^y	30.33 $\pm$ 9.51 ^y	30.38 $\pm$ 7.93 ^z	28.31 $\pm$ 8.48 ^y
MMP (%)	0h	47.27 $\pm$ 14.77 ^{a.x}	42.19 $\pm$ 14.23 ^{ab.xy}	36.50 $\pm$ 15.01 ^{bc.x}	29.49 $\pm$ 14.56 ^c
	30 min	36.41 $\pm$ 15.71 ^{a.y}	33.14 $\pm$ 17.39 ^{ab.x}	30.96 $\pm$ 15.40 ^{ab}	23.87 $\pm$ 13.19 ^b
	60 min	26.22 $\pm$ 17.53 ^z	23.96 $\pm$ 15.36 ^y	23.43 $\pm$ 17.58 ^y	16.36 $\pm$ 12.91
ACi (%)	0h	25.46 $\pm$ 23.09	25.54 $\pm$ 26.16	23.00 $\pm$ 19.72	24.67 $\pm$ 24.19
	30 min	20.58 $\pm$ 19.99	22.71 $\pm$ 22.35	23.67 $\pm$ 23.53	19.46 $\pm$ 22.77
	60 min	18.92 $\pm$ 17.29	21.04 $\pm$ 20.09	20.46 $\pm$ 15.77	17.21 $\pm$ 15.90

PMI: plasmma membrane integrity; MMP: mitochondrial membrane potential; ACi: acrosome integrity.

^{abc} Lowercase letters on the same line represent difference between treatments (p<0.05).

^{xyz} Lowercase letters in the same column represent time difference (p<0.05).

ANEXO A – RECOMENDAÇÕES DA REVISTA



ISSN 1984-3143, online and 1806-9614, print

Guidelines and Policies

The Editorial Policies and Guidelines outlined here must be followed. If you have any questions, please contact us prior to your submission.

Editorial Policies

General policies

Submitted manuscripts must be original and should not be under simultaneous consideration by any other publication or have been previously published in any form or medium. Furthermore, if the article has already undergone any previous evaluation, the corresponding decision letter must be attached during submission, and this fact should be mentioned in the submitted Cover Letter. All authors are entirely responsible for all data, concepts and information contained in the article.

Article processing charges

This journal does not have submission charges. Animal Reproduction charges only a flat fee after the acceptance of the article. There are three different values for the Article Processing Charge (APC), as follows:

- R\$ 1600,00 for non CBRA members
- R\$ 800,00 for CBRA members
- US\$ 650,00 for foreign authors

APC payment of accepted articles must be processed through the following link: <http://cabra.org.br/pages/pagamento/payment-select.jsp>

Waiver and discounts

Authors from low-income countries and without access to grant to cover Article Processing Charges may request a waiver or discount after their manuscript is accepted for publication. Waiver and discounts must be requested through the journal contact page, and should include the accepted manuscript information and author reasons for requesting the waiver or discount.

Open access, copyright and self-archiving policies

This is an open access journal which means that all content is freely available without charge to the user or his/her institution. Users are allowed to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of the articles, or use them for any other lawful purpose, without asking prior permission from the publisher or the author. This is in accordance with the BOAI (Budapest Open Access Initiative) definition of open access. Accepted articles will be published as Open Access and distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Authors of articles published by Animal Reproduction retain copyright of their work without restrictions, licensing it under the Creative Commons Attribution License, which allows articles to be re-used and re-distributed without restriction, as long as the original work is correctly cited.

Animal Reproduction encourages Authors to self archive accepted manuscripts by posting them in personal blogs, institutional repositories and scientific social medias, as well as on their personal social medias, as long as the full citation to the journal website version is included.

Language

All manuscripts must be written in Standard American English. We recommend Merriam-Webster's Dictionary (<http://www.m-w.com/>) for spelling check and the EASE Guidelines for Authors and Translators of Scientific Articles to be Published in English (<http://www.ease.org.uk/publications/author-guidelines>). Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by a reviewer familiar with scientific language and vocabulary, or by a specialized company, and present a certificate of English editing. Manuscripts not written in acceptable Standard English will be returned to the author before being sent to the scientific reviewers.

Peer Review Process

Animal Reproduction has a 3-stage review process:

1. All submitted manuscripts undergo a technical verification for compliance with Animal Reproduction policies and manuscript preparation guidelines. Submissions that fail to comply will be un-submitted so that the authors can fix the problems and resubmit them.
2. Manuscripts are then sent to the Editor-in-chief, who performs a pre-evaluation that includes originality, scope and journal fit. Rejected manuscripts will not be sent to peer-review and will be returned to the authors with the reasons for such editorial decision. The Editors strive to accomplish this first screening stage and send their decision in 70 days.
3. Manuscripts accepted in this first screening will be sent for a single blind evaluation by at least two reviewers. After the ad hoc reviewers finish their evaluation, the handling Editor will return the manuscript to the authors with an accepted, rejected, or for review decision, according to the reviewers' suggestions. Revised manuscripts submitted by the authors will be sent to the Editor-in-chief for final decision, and reviewers might be asked to perform additional evaluations.

Section Policies

Animal Reproduction does not impose a limit on the number of words and references for Original and Review articles, but editors and reviewers might make recommendations regarding text clarity and quality and excess or lack or relevance of references.

Original Articles

Articles reporting original research studies and/or data related to the subject fields covered by Animal Reproduction.

Original Articles are open for author submission and must not have been previously published elsewhere.

Review Articles

Review Articles of interest to the field of animal reproduction will be submitted by direct invitation of the editorial board, but authors might also submit review manuscripts.

Short Communications

Short Communications must report or be related to new techniques involved in the biology of reproduction.

They are open for author submissions and must have a maximum of 2000 words, including the list of references, and only two panel figures and two tables.

Conference proceedings

The Journal publishes full original papers, abstracts and workshops when presented in conferences from Scholarly Societies of Animal Reproduction supported by the journal.

Authorship and Disclosures

Authorship byline

Authors must agree on the manuscript authorship making sure it accurately illustrates and includes contributors who actually and significantly contributed to the work. All those listed as authors should qualify for authorship according to the substantial contributions on the concept and design the work, data acquisition, interpretation and evaluation, and should have been actively involved during manuscript revision and approval of the final manuscript version, with substantial and intellectual involvement, specially in the results discussion.

Author contributions and responsibility

All authors must approve the final version of the manuscript and be responsible for each part of collaborative work done in its final version. In addition, each author's specific contribution according to the CRediT's standard designations available at <https://www.casrai.org/credit.html>, should be included in the Cover Letter as outlined in the manuscript preparation guidelines.

Changes in Authorship after Submission

Any changes in authorship during the revision process of the manuscript will only be considered by the editors if important additional experiments or relevant contributions have been made and justified. Such changes in authorship must be requested in the revised version submission letter, and they need to be described in detail, explaining their rationale.

Acknowledgments

Contributions from anyone who does not meet the authorship criteria should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical support, collaboration of

data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support).

Conflict of Interest

Authors are required to include a statement disclosing any potential conflicts of interest. Animal Reproduction considers potential conflicts of interest any event of a personal, commercial, political or academic nature, whether or not involving financial compensation.

Funding disclosure statement

All financial support received must be disclosed by all authors. Use the author's initials followed by a short description and include the funding agency's name and grant identification number(s), in that order.

Research ethics and publication malpractice

Authors, Editors and Reviewers are expected to follow the highest level of ethics throughout research, data acquisition and processing, and manuscript writing, evaluation and publishing.

During the evaluation stages authors, reviewers and editors should report to the Editor-in-Chief whenever they observe a potential conflict of interest that may influence manuscript design or evaluation. Animal Reproduction considers potential conflicts of interest any event of a personal, commercial, political or academic nature, whether or not involving financial compensation. Animal Reproduction Editors will take active measures regarding any ethical or misconduct concerns either during evaluation or after publication. Whenever necessary, issues will be investigated according to the Committee on Publication Ethics (COPE) flowcharts available at <https://publicationethics.org/>.

As of 2019, Animal Reproduction will actively scan submitted manuscripts using the Similarity check (<https://www.crossref.org/services/similarity-check/>) system provided by CrossRef.

Authors, Reviewers and Editors are encouraged to report any suspected research ethics or publication malpractice issue using the journals contact page or by directly writing to the CBRA Publications or Scientific Affairs directors.

All reports of suspected misconduct will be investigated and, when required, corrections, retractions or expressions of concern will be published.

Human and animal rights

Authors must include a statement detailing compliance with guidelines and/or ethical approval in the material and methods section of the manuscript. Editors might request authors to send a copy of the official letter of approval from the ethics committee. Authors are encouraged to conform to the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines for reporting animal studies, available at <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>. Clinical trials are not the focus of the Journal; however, preclinical trials and use of animals in the experiments will be critically evaluated to avoid animal suffering and verifying that animal rights are being respected. In researches involving pets or whenever required, authors should collect and archive a signed informed consent form from the pet owner.

Reporting Guidelines

Authors are encouraged to follow good practices when designing and writing their work. Animal Reproduction recommends authors to seek appropriate guidelines on the type of study they are reporting and suggests the following resources, as stated on the ICMJE - International Committee of Medical Journal Editors:

- **ARRIVE** (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) for reporting animal studies,
- **PRISMA** for systematic reviews and meta-analyses,
- **STARD** for studies of diagnostic accuracy, and
- **EQUATOR Network** and the NLM's **Research Reporting Guidelines and Initiatives** for other guidelines.

Furthermore, review manuscripts should describe the methods used for locating, selecting, extracting, and synthesizing the data.

Manuscript preparation guidelines

Units of measurements

Units of measurements must be used according to the International System of Units.

Abbreviations and Symbols

Abbreviations, acronyms and Symbols should be avoided, unless widely adopted. When using acronyms or abbreviations, their meaning should be fully spelled upon their first occurrence in the text.

Cover Letter

Filename: **coverletter.doc**

The cover letter must be uploaded in the submission system at the appropriate step, and should include the following elements:

Manuscript presentation

A brief presentation describing the research, highlighting why the authors believe it is suited for publication in Animal Reproduction. This presentation should also mention if the manuscript has already undergone evaluation by other journals and, if so, the final decision letters and reports must be uploaded in the submission system under the “Supplemental file NOT for Review”.

Conflict of interest statement

Authors are required to include a statement disclosing any potential conflicts of interest. In the event that there are no conflicts worth mentioning by any of the authors, then the following statement should be included: The authors have no conflict of interest to declare.

Example:

Conflict of interest statement:

HSA declares having received financial compensation for giving training at the company that provided the equipment used in this research (ACME Corporation) previously to conducting the research related to this work, and wishes to disclose that this did not interfere in any way with the study. The other authors did not have any conflict of interest to disclose.

Funding disclosure statement

Use author initials followed by a short description, as described in our policies, and make sure to include the funding agency’s name and grant identification number(s), in that order.

Example:

Funding statement:

HSA received funding for this research from This Funding Agency (grant numbers #555-2018 and #123-2018) and This Other Agency (grant number #312556-15).

Author contributions

Each author’s contribution must be included using Author initials and the standard CRediT taxonomy available at <https://www.casrai.org/credit.html>.

Example:

Author contributions:

LGP: Conceptualization, Funding acquisition, Supervision, Writing – original draft,

Writing – review & editing; RAP: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing – original draft, Writing – review & editing; AVP: Data curation, Formal analysis;

Data sharing statement

The authors' statement regarding deposit and availability of raw data should indicate whether the data is available and how it can be obtained. If data cannot be made available, authors should state the reason for that.

Copyright Agreement Form

Filename: **agreement.doc**

As stated in our policies, the copyright remains with the authors. However, the corresponding author is required to upload the “Animal Reproduction Authorship Responsibility, Copyright and Publishing License Agreement” available at <https://docs.google.com/document/d/14leb99gz-gbFqmYxh1sQsRSYnQL7qtjcxX1uEGgrzOM/edit> signed on behalf of all authors.

This file must be uploaded in the submission system under the “Copyright Agreement Form” designation.

Main Document

Filename: **manuscript.doc**

The main document file for the manuscript must be formatted using Microsoft Word© 2010 or more recent. Pages must be set to A4 (21.0 x 29.7) size, with 3 cm margins, using Times New Roman font size 12 without unnecessary formatting, double spaced, with numbered lines and pages. Sections and subsection titles should use the built-in Heading Styles.

The main document must be structured as described in the following sections:

1. Title page

The first page of the manuscript must include the following information.

Article type

Indicate the same article type as selected in the submission system: Basic Research Article, Biotechnology Article, Applied Research Article, or Review Article.

Running title

1 No more than 50 letters, including spaces.

2 **Manuscript Title**

3 The title should be succinct but include the study design and major findings.

4 Title words should be in bold, with only the first letter of the first word in uppercase.

5 **Authorship byline**

6 The full names of all authors are to be listed below the title. Follow each name with
7 superscript Arabic numerals to indicate their affiliations, and include the ORCID URL
8 of all authors in parenthesis. An asterisk (*) must be used to indicate the corresponding
9 author.

10 **Example:**

11 Rex Rex A. Hess^{1,2} (<https://orcid.org/0000-0003-2345-6789>), Kay
12 Carnes² (<https://orcid.org/0000-0002-2345-6789>), Luiz Renato
13 França^{3*} (<https://orcid.org/0000-0001-2345-6789>)

14 ⇒ Authors who do not have an ORCID must register at <https://orcid.org>.

15 **Affiliations**

16 Author affiliations should be listed below the authors' names using the same superscript
17 Arabic numerals used in the byline. The affiliation list must include only institutions
18 where each author actually carried out work related to the article.

19 Names of Institutions should be written in their original language or English when not
20 in Roman alphabet.

21 **Example:**

22 ¹ Full Institution Name, Department, City, State, Country
23 ² Nome da Instituição no seu Idioma de Origem, Department, City, State, Country
24 ³ Full Institution Name, Department, City, State, Country

25 **Correspondence information**

26 The Corresponding author's name, email and postal address should be listed after the
27 affiliations and identified with an asterisk (*).

28 **Example:**

29 * Correspondence: Full Author Name, corresponding@author.email.com, full postal
30 address.

1 2. Abstract

2 The purpose of the work must be clearly and briefly stated and include the methods and
3 summarized conclusions. Word number limit: 300 words.

4 3. Keywords

5 Keywords should be listed after the abstract. Maximum of five keywords.

6 4. Introduction

7 This section should provide background information leading to the hypothesis tested. It
8 should end with a very brief statement of the objectives of the work.

9 5. Methods

10 The methods should include the design of the study, type of materials involved, number
11 of animals per group, a clear description of all methods used and/or clear references to
12 published methods, and the type of analysis used.

13 Information about registration and ethics committee approval must be insert at the end
14 of this section, including a complete description of data and location where the
15 experiment was conducted, and required authorizations for animal or animal tissue
16 obtained.

17 6. Results

18 Main results found should be clearly and objectively stated. This section may be broken
19 into subsections with short, informative headings.

20 7. Discussion

21 This section may be broken into subsections with short, informative headings. The
22 discussion should be focused on the results found. It is recommended that the main
23 conclusions supported by the research data be stated as a last paragraph.

24 8. Conclusion

25 Main conclusions supported by the research data and discussion must be clearly and
26 objectively stated.

27 9. Acknowledgments

28 Collaborators that do not meet the authorship criteria as stated in our policies should be
29 mentioned in this section if they have granted their permission.

10. References

The references section must begin on a new page and follow the Vancouver style, as described ahead. All references must be cited and the correctness of all information is the author's responsibility.

11. Tables

A set of alphanumeric data that is organized in lines and columns. All tables must be included at the end of manuscript, each on a separate page. Tables must be as simple as possible, and only horizontal lines should be used at the top and bottom of the table. Table cells must never be split with diagonal lines. The table legends must precede it and start with the word "Table" followed by its number in Arabic numerals. Tables must be cited in the text as Table 1, Table 2, etc., in the order that they are included. All abbreviations or annotations should be explained in footnotes; if necessary, symbols should be used to include the explanations (*, †, ‡, §, etc.).

12. Figures and figure legends

Any illustration that contains line drawings, photographs, graphics, schemes, flowcharts, etc. should be cited as figures. Each figure should be identified and submitted in a separate high-resolution file, making sure that the smallest text is perfectly readable. The list of figure legends should begin on a new page at the end of the manuscript. Figures must be cited in the numerical order that they are listed; e.g., Fig. 1, Fig. 2, Figs. 1-2, etc.

When necessary, authors are responsible to collect appropriate authorization to use images, pictures and illustrations from other sources according to their original copyright owner and include proper citation.

References and citation style

The references section must follow the Vancouver style. A small sample of the most commonly used bibliographic references is included ahead. An extensive list with many more examples and details is available at http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

All references must be cited and the correctness of all information is the author's responsibility.

References must be listed first in alphabetical order, then by year using lower case letters to differentiate references of the same authors and year.

Use "in press" only when formal acceptance has been granted.

1 Text citations

2 All references must be cited using the Author-Date style as shown in the following
3 examples:

- 4 1. sole author: (Ginther, 1992) or Ginther (1992).
- 5 2. two authors: (Varley and Foxcroft, 1990) or Varley and Foxcroft (1990).
- 6 3. more than two authors: (Quintero et al., 2000) or Quintero et al. (2000).
- 7 4. more than one paper cited: (Varley and Foxcroft, 1990; Ginther, 1992; Gastal et
8 al., 1999a, b; Quintero et al., 2000) or Varley and Foxcroft (1990); Ginther
9 (1992); Gastal et al. (1999a, b); Quintero et al. (2000), always cited in ascending
10 chronological order.

11 Reference style sample list

12 For ARTICLES IN JOURNALS:

- 13 • Gastal EL, Gastal MO, Ginther OJ. Experimental assumption of dominance by a
14 smaller follicle and associated hormonal changes in mares. Biol Reprod.
15 1999a;61(3):724-30. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod61.3.724>.
16 PMID:10456850.
- 17 • Gastal EL, Donadeu FX, Gastal MO, Ginther OJ. Echotextural changes in the
18 follicular wall during follicle deviation in mares. Theriogenology.
19 1999b;52(5):803-14. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00173-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00173-9).
20 PMID:10735121.
- 21 • Hess RA, Carnes K. The role of estrogen in testis and the male reproductive
22 tract: a review and species comparison. Anim Reprod. 2004;1:5-30.
- 23 • Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello DZ, Geiger LN, Schenk JL,
24 Wiltbank MC. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein
25 heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. Anim Reprod.
26 2004;1:86-90.
- 27 • Varley MA, Foxcroft GR. Endocrinology of lactating and weaned sow. J Reprod
28 Fertil Suppl. 1990;40:47-61. PMID:2192052.

29 For BOOKS, DISSERTATIONS AND CONFERENCES:

- 30 • Basrur PK, Kochhar HS. Inherited sex abnormalities in goats. In: Youngquist
31 RS, Threlfall WR, editors. Current therapy in large animal theriogenology.
32 Philadelphia: WB Saunders; 1997. p. 590-4.
- 33 • Ginther OJ. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2nd
34 ed. Cross Plains: Equiservices Publishing; 1992. p. 105-72.
- 35 • Leal MC. Análise morfológica e funcional do testículo e eficiência
36 espermatogênica em *Saguís Callithrix penicillata* (Primates: Callitrichidae)

[dissertation]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004. Portuguese.

- Quintero B, Porter M, Sharp D, Cleaver B, Diaz T. Effect of season on LH concentrations and LH pulse dynamics in mares located in the tropics. In: Abstracts of the 14th International Congress on Animal Reproduction; 2000 Jul 2-6; Stockholm, Sweden. Stockholm: ICAR; 2000. p. 290.

For ELECTRONIC DOCUMENTS:

CD-ROM:

- Anderson SC, Poulsen KB. Anderson's electronic atlas of hematology [CD-ROM]. 2nd version. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. 1 CD-ROM: color, 4 3/4 in.

Journal article on the Internet:

- Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2019 Jul 25];102(6):[about 3 p.]. Available from: https://journals.lww.com/ajnonline/Abstract/2002/06000/Quality_Improvement_Initiative_in_Nursing_Homes.31.aspx.

Monograph on the Internet:

- Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2019 Jul 25]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site:

- Cancer Pain [homepage on the Internet]. New York: American Cancer Society; 2019 [cited 2019 Jul 25]. Available from: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/physical-side-effects/pain.html>.

Part of a homepage/Web site:

- AMA [homepage on the Internet]. Chicago: American Medical Association; 1995-2019. What's healthy dying? 6 steps on the path for doctors to know; 2019 Jul 22 [cited 2019 Jul 25]; [about 2 screens]. Available from: <https://www.ama-assn.org/delivering-care/ethics/what-s-healthy-dying-6-steps-path-doctors-know>.

Open database on the Internet:

- Who's Certified [database on the Internet]. Alexandria (VA): American Board of Facial Plastic and Reconstructive Surgery; 2019 [cited 2019 Jul 25]. Available from: <https://www.abfprs.org/certified/disclaimer>.

Closed database on the Internet:

- Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly, Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine; 2001 [cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html.

Part of a database on the Internet:

- MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine; 2002. Meta-analysis; unique ID: D015201; [cited 2003 Jun 10]; [about 3 screens]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>.

For NON PUBLISHED WORK:

- It should be mentioned only in the text, and not in the list of references.

For VERBAL INFORMATION:

- References concerning unpublished data and “personal communications” should not be cited in the reference list, but should be mentioned in the text. After the information, the author must write the expression “verbal information” or “personal communication”.

Manuscript Submission

All manuscripts must be submitted using the online submission system available at <https://mc04.manuscriptcentral.com/ar-scielo>.

Data sharing policies

Animal Reproduction is developing its data sharing policies with the TOP (Transparency and Openness Promotion) Guidelines in mind.

As of July 2019, Animal Reproduction is encouraging authors to deposit their research data into the relevant data repository and include a citation and link to the dataset in the submitted articles. If this is not possible, authors should make a statement in the Cover Letter explaining why research data cannot be shared.

Corrections and retractions policy

1 Animal Reproduction fully endorses the ICMJE recommendations regarding scientific
2 misconduct and is committed to publishing corrections when problems are detected in
3 published information that affect the publication record and/or its scientific accuracy.
4 Editors will follow the ICMJE recommendations and the procedures detailed by
5 the Committee on Publication Ethics (COPE) when suspected misconduct arises, before
6 or after publication. CBRA Scientific Affairs and Publications Directors might be called
7 to assist with the investigation but final decision to publish corrections, expressions of
8 concern, or retracting published articles will be made by the Editor-in-Chief.

9 Authors, Reviewers and Editors are encouraged to report any suspected research ethics
10 or publication malpractice issue using the journals contact page or by directly writing to
11 the CBRA Publications or Scientific Affairs directors.

12
13 **LINKS:**

14 Submission System: <https://mc04.manuscriptcentral.com/ar-scielo>

1
2

ANEXO B – CERTIFICADO CEUA



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

Reitoria



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Diluidor seminal acrescido de gás ozônio para a criopreservação de sêmen equino: efeito sobre a viabilidade de células espermáticas", protocolada sob o CEUA nº 4277190820 (ID 001208), sob a responsabilidade de **Sildivane Valcácia Silva e equipe; Iara Nóbrega Macêdo** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - 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), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 18/09/2020.

We certify that the proposal "Seminal extender plus ozone gas to stallion semen cryopreservation: effect to sperm cell viability", utilizing 4 Equines (3 males and 1 females), protocol number CEUA 4277190820 (ID 001208), under the responsibility of **Sildivane Valcácia Silva and team; Iara Nóbrega Macêdo** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 09/18/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 10/2020 a 06/2021

Área: [Ciências Veterinárias](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [3 a 12 anos](#)

N: [3](#)

Linhagem: [Quarto-de-Milha](#)

Peso: [500 a 800 kg](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [12 a 12 anos](#)

N: [1](#)

Linhagem: [Sem raça definida](#)

Peso: [500 a 500 kg](#)

Local do experimento: Fazenda e Haras Santa Fé - Sapé, Paraíba

João Pessoa, 18 de setembro de 2020

Prof. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba