

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 03/09/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**EFEITO DO GLICEROL E AMIDAS EM DIFERENTES CURVAS DE
REFRIGERAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CONGELADO EQUINO**

Sidnei Nunes de Oliveira

Botucatu – SP

Março/2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**EFEITO DO GLICEROL E AMIDAS EM DIFERENTES CURVAS DE
REFRIGERAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CONGELADO EQUINO**

Sidnei Nunes de Oliveira

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor no programa de pós-graduação em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu – SP
Março/2020

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

Oliveira, Sidnei Nunes.

Efeito do glicerol e amidas em diferentes curvas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen congelado equino / Sidnei Nunes Oliveira. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Frederico Ozanam Papa
Capes: 50504002

1. Equino - Reprodução. 2. Preservação do sêmen.
3. Criopreservação. 4. Espermatozoides.

Palavras-chave: Criopreservação; Crioprotetores; Espermatozoides; Garanhão; Taxa de refrigeração.

Nome do autor: Sidnei Nunes de Oliveira

Título: EFEITO DO GLICEROL E AMIDAS EM DIFERENTES CURVAS DE REFRIGERAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CONGELADO EQUINO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e orientador

Dep. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP – Botucatu /SP

Prof. Dr. José Antônio Dell’Aqua Junior

Membro

Dep. Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Membro

Dep. Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP – Botucatu/SP

Prof^a. Dr^a. Priscila Nascimento Guasti

Membro

Faculdade de Garça FAEF

Dr. Marcio Teoro do Carmo

Membro

Médico Veterinário Autônomo

Data da defesa: 03 de março de 2020.

Dedicatória

Dedico a Deus, à minha família, aos mestres, amigos e colegas com quem tive o privilégio do compartilhar conhecimentos, momentos de felicidade e tristezas, erros e acertos; o crescimento pessoal, profissional e toda a persistência que alimenta a busca incansável pelos meus objetivos, sonhos e realizações são graças ao apoio pleno de vocês!

Agradecimentos

Ao grande Deus pela força espiritual que me rege e por iluminar os meus caminhos nessa longa e ininterrupta jornada.

A minha família, meu porto seguro, meu pai Sebastião, minha mãe Angelita, minha irmã Alane Kelly, a minha avó Mariazinha, meus Tios Alex, Amarildo, Sônia, Norma e Sonilde “in memoria”, mesmo estando distantes suportando as saudades, são eles meus grandes incentivadores, sem eles todas as minhas conquistas não fariam sentido.

Ao grande mestre idealizador e incentivador deste projeto, o Prof. Papa que me acolheu durante ao longo do tempo desde a residência, mestrado e doutorado, e juntos desenvolvemos um trabalho em equipe.

Aos professores Nereu “Néris” pelos ensinamentos e pelos abraços de apoio durante todas as etapas, Marco Alvarenga pelas oportunidades, ensinamentos, considerações e conselhos, ao José Dell’Aqua pela ajuda, apoio, ideias para desenvolvimento deste projeto, horas de discussão e incentivo muito grato por isso. A todos os outros professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

Sou grato aos funcionários do departamento pelo apoio no dia a dia a Camila Dell’Aqua, Edvaldo, D. Raquel, Edilson, Felipe, Evandro meu muito obrigado.

A Rafaella Hayashi, pelo apoio, companheirismo, pela paciência nos momentos de estresse e ter me aturar durante alguns anos, as palavras são gratidão.

Aos velhos amigos de longas jornadas Bertiny, Luis Fernando e Endrigo, e aos tantos outros que aqui ganhei e me ajudaram e continuam ajudando desde a residência, mestrado e doutorado em especial a Catarina, Paula, Lucas Troncarelli, Marquinhos, Guilherme Fávaro, Guilherme Alemão, Rebeca, Emanuel, Erick, Felipe Dalanezi, Lorenzo, Mariana Gobato, Bandeira, Luiz Roberto Jr, Patricia Papa, Marcio Teoro.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Botucatu-SP, pela oportunidade de cursar o Doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Código de Financiamento 001, pelo apoio fornecido em forma de bolsa e auxílio financeiro.

Agradeço também aos parceiros que contribuíram para a realização deste projeto: Haras e Fazenda Caraúna, Paint Collection.

Assim finalizo agradecendo a todos aqueles que de alguma forma contribuíram em mais uma etapa/ciclo da minha história que não se finda, meu muito obrigado.

“Por mais longo que sejam os caminhos sempre existirá quem o percorra e alcance seu destino. Desta forma, sigo sonhando alto, planejando as estradas ainda não percorridas sempre com humildade e fé no pai celestial”.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALH	amplitude lateral de cabeça
ATP	adenosina trifosfato
CaCl ₂	cloreto de cálcio
cm	centímetro
CO ₂	gás carbônico
DMA	dimetilacetamida
FADH ₂	flavina-adenina-dinucleotídeo reduzida
GLY	glicerol
DMF	dimetilformamida
DNA	ácido desoxirribonucleico
PMD	desestabilização da membrana plasmática
HMP	alto potencial mitocondrial
H ₂ O	água
KCl	cloreto de potássio
Kg	kilograma
LN ₂	nitrogênio líquido
LIN	linearidade
MF	metilformamida
min	minuto
MgCl ₂	cloreto de magnésio
Mg	magnésio
mL	mililitro
Mol	Molar
mOsm	miliosmol
MP	motilidade progressiva
MST	MitoStatus Red
MT	motilidade total
mW	megawatt
NADH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida
ng	nanograma

nm	nanômetro
NaCl	cloreto de sódio
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
NaH ₂ PO ₄	fosfato monossódico
pH	potencial hidrogeniônico
PKa	constante de acidez
sptz	espermatozoide
STR	progressividade
RAP	número de espermatozoides rápidos
rpm	rotação por minuto
UA	unidade arbitrária
VAP	velocidade média da trajetória
VCL	velocidade curvilínea
VRA	valor referência ajustado
VSL	velocidade linear progressiva
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
µm	micrômetro
µm/s	micrômetro por segundo
v/v	volume/volume
10 ⁶	milhão
<	menor
>	maior
~	aproximadamente
%	percentual
°C	graus Celsius
±	mais ou menos

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2

Tabela 1. Valores da cinética espermática pós-descongelação entre diferentes curvas positivas de refrigeração com ou sem estabilização e diferentes crioprotetores no sêmen congelado de garanhões.....71

Tabela 2. Valores pós-descongelação de células com estabilização da membrana plasmática e alto potencial mitocondrial entre diferentes curvas de refrigeração com ou sem estabilização no sêmen congelado de garanhões.....72

Tabela 3. Valores da cinética espermática, estabilização da membrana plasmática e potencial mitocondrial entre diferentes crioprotetores no sêmen congelado de garanhões.....73

Tabela 4. Valores de cinética espermática, estabilização da membrana plasmática e alto potencial mitocondrial entre diferentes curvas positivas de refrigeração com ou sem estabilização no sêmen congelado de garanhões.....74

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

FIGURA 1. Estrutura da célula espermática.....	24
FIGURA 2. Bicamada fosfolipídica da membrana plasmática do espermatozoide na forma fisiológica.....	27
FIGURA 3. Mitocôndria: Localização e disposição dos compartimentos mitocondriais.....	28
FIGURA 4. Disposição dos complexos enzimáticos NADH-Desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), citocromo bc_1 (complexo III), citocromo oxidase (complexo IV) e ATP-sintase (complexo V), responsáveis pela cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria.....	29
FIGURA 5. Esquematisação da cadeia de transporte de elétrons, formação da adenosina trifosfato (ATP) durante a fosforilação oxidativa.....	30
FIGURA 6. Representação esquemática do papel dos crioprotetores intracelulares durante a criopreservação do sêmen equino. Os protetores encontram-se tanto no meio intra quanto extracelular, durante a curva negativa abaixo de -5°C os cristais de gelo começam a serem formados. Deixando o meio extracelular hiperosmótico pela concentração de solutos não congelados, as moléculas de água tendem a se deslocarem para o meio hiperosmótico, passando através das aquoporinas. Nesse momento, os crioprotetores exercem uma importante função de impedir a saída de água através das ligações com a água e pelo também aumento de solutos intracelular.....	31
FIGURA 7. Fases da bicamada fosfolipídica da membrana plasmática do espermatozoide, duas fases distintas de acordo com a temperaturas que se encontram: A - Fase fluída a temperatura de 37°C , B - Mudança para a fase de gel temperatura entre 30°C e 10°C	38

FIGURA 8. Momento do início da formação dos cristais de gelo extracelular (-10°C e -15°C), nesse momento há concentração de soluto no meio extracelular, células estão super-resfriadas, ocorre a redução do volume das células espermáticas pela migração da água do citoplasma para o meio extracelular.....41

FIGURA 9. Representação esquemática dos prováveis acontecimentos físicos durante a criopreservação do sêmen equino. As estrelas representam formação de cristal de gelo intra e extracelular durante a curva negativa (-5°C). Durante a refrigeração a água sai das células induzida pela formação dos cristais de gelo, aumento dos solutos extracelular se torna um ambiente hiperosmótico, resultando na desidratação dos espermatozoides (-10°C a -80°C). As setas indicam a saída de água de dentro dos espermatozoides.....43

FIGURA 10. Representação esquemática dos prováveis acontecimentos físicos durante a descongelação do sêmen equino. A taxa de descongelação deve ser proporcional a taxa de descongelação: sêmen congelado em curva rápida a descongelação deve ser rápida; sêmen congelado em curva moderada a descongelação deve ser moderada; sêmen congelado em curva lenta a descongelação deve ser lenta. As setas indicam a entrada de água para dentro dos espermatozoides.....44

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 2

FIGURA 1. Representação gráfica das diferentes curvas de refrigeração (C1): velocidade de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ entre 25°C e 5°C ; Curva 2 (C2): velocidade de $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ entre 25°C e 5°C ; Curva 3 (C3): $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ entre 25°C à 5°C mantido por + 15 min de estabilização à 5°C ; Curva 4 (C4): $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ entre 25°C à 5°C mantido por + 75 min de estabilização à 5°C67

FIGURA 2. Graficos em histograma das amostras de sêmen (Glycerol, Methylformamide, Dimethylformamide and Dimethylacetamide) representativas de fluorescência de YOPRO (Y3603, life technologies) e MitoStatus Red (564697, BDPharmigen), avaliadas por citometro de fluxo LSRFortessa (Becton Dickinson Corp., Franklin Lakes, NJ, EUA). Histogramas da coluna à esquerda representativos de estabilidade de membrana (% HPM, ou seja, células sem marcação por YOPRO; STABLE) sendo respectivamente para os grupos Glycerol, Methylformamide, Dimethylformamide and Dimethylacetamide; e histogramas da coluna a direita representando a avaliação da porcentagem de células com alto potencial mitocondrial (%HMP) e da avaliação qualitativa do potencial mitocondrial, sendo determinada pela mediana da intensidade de fluorescência (APC mediam; U.A.); os valores da avaliação qualitativa foram considerados apenas sobre as células com membrana plasmática estável (rosa), sendo respectivamente para os grupos Glycerol, Methylformamide, Dimethylformamide and Dimethylacetamide. A partir disso foi calculado um valor referência ajustado (VRA) da mediana do potencial mitocondrial das células com membrana plasmática estável pela porcentagem dessas células (box).....69

FIGURA 3. Representação do movimento celular encontrado pós-descongelação do sêmen de garanhão criopreservado com diferentes crioprotetores; glicerol (**GLY**), metilformamida (**MF**), dimetilformamida (**DMF**) e dimetilacetamida (**DMA**). Pontos em cor preta representa a posição da cabeça do espermatozoide gravadas em vídeos com 30 quadros consecutivos em 0,5 segundos. Linha em vermelho representa o caminho médio percorrido entre o ponto de partida e chegada do espermatozoide.....75

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Histórico da criopreservação do sêmen.....	19
2.2. Estrutura do espermatozoide equino.....	21
2.3. Membrana plasmática do espermatozoide.....	24
2.4. Metabolismo das células espermáticas.....	27
2.5. Crioprotetores.....	30
2.5.1. Crioprotetores não penetrantes.....	31
2.5.2. Crioprotetores penetrantes.....	32
2.5.2.1. Glicerol.....	33
2.5.2.2. Amidas.....	35
2.6. Princípios da criopreservação.....	36
2.7. Diferentes curvas de congelação entre crioprotetores.....	44
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
REFERÊNCIAS.....	48
HIPÓTESE.....	59
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59

CAPÍTULO II

ARTIGO I - Efeito do glicerol e amidas em diferentes curvas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen congelado equino.....	61
Resumo.....	61
1. Introdução.....	62
2. Material e Métodos.....	64
2.1. Animais e local da pesquisa.....	64
2.2. Colheita e avaliação seminal.....	65
2.3. Criopreservação do sêmen.....	66
2.4. Avaliação pós-descongelação.....	67
2.4.1. Cinética espermática.....	67
2.4.2. Citometria de Fluxo.....	68
2.4.2.1. Estabilidade da Membrana Plasmática e Potencial Mitocondrial....	68

<i>2.5. Análise estatística.....</i>	70
3. Resultados.....	70
4. Discussão.....	75
Conclusão.....	84
Referências.....	85

RESUMO

OLIVEIRA, S.N. EFEITO DO GLICEROL E AMIDAS EM DIFERENTES CURVAS DE REFRIGERAÇÃO SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN CONGELADO EQUINO. Botucatu – SP. 2020, p.90. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Durante o processo de criopreservação os espermatozoides de garanhões sofrem danos osmóticos que são irreversíveis. Mesmo utilizando-se as melhores técnicas de criopreservação, este processo ainda é prejudicial às células espermáticas sendo em média a taxa de sobrevivência espermática em torno de 50%. Além disso, ainda há uma porcentagem de espermatozoides sobreviventes portadores de danos subletais, fazendo com que seja limitada a capacidade de sobrevivência das células espermáticas após a descongelação e como consequência existe uma queda na fertilidade. Está bem estabelecido que os espermatozoides de diferentes garanhões domésticos variam significativamente em criosensibilidade, este fato pode estar relacionado com o efeito do crioprotetor, assim como pode ter relação com o tamanho molecular do crioprotetor penetrante e curva de refrigeração utilizada. Enquanto o glicerol continua a ser o crioprotetor mais comum para espermatozoides, existem fatores limitantes pelo seu uso, incluindo danos na membrana através de um efeito osmótico, sendo assim, as amidas têm sido estudadas com o objetivo de minimizar os efeitos causados pelo glicerol durante o processo de criopreservação, por apresentarem melhor crioproteção da membrana das células espermáticas. Sendo assim, a proposta desse trabalho foi avaliar diferentes crioprotetores em diferentes curvas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen equino. Para tanto, o estudo foi realizado para avaliar o efeito dos crioprotetores glicerol, metilformamida, dimetilformamida e dimetilacetamida em concentração a 5% em quatro curvas de refrigeração: $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ com estabilização à 5°C de 15min e 75min em refrigeração automática através da Mini-Digitcool ZH 400. Como resultado, o glicerol foi o crioprotetor que possibilitou melhor motilidade progressiva assim como alto potencial mitocondrial, apesar disso, esse crioprotetor provocou mais lesões a membrana plasmática. Por outro lado, a dimetilformamida foi o crioprotetor que melhor protegeu a membrana das células espermáticas pós-descongelação. A curva que possibilitou melhor viabilidade espermática em associação da cinética, potencial mitocondrial e integridade da membrana foi a curva de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$.

Palavras-chave: criopreservação, taxa de refrigeração, garanhão, espermatozoide, crioprotetores.

ABSTRACT

OLIVEIRA, S.N. EFFECT OF GLYCEROL AND AMIDES ON DIFFERENT COOLING RATES ON THE QUALITY OF FROZEN EQUINE SPERM. Botucatu – SP. 2020 p.90. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

During the cryopreservation process, sperm from stallions suffer osmotic damage that is irreversible. Even using the best cryopreservation techniques, this process is still harmful to sperm cells, with an average sperm survival rate of around 50%. In addition, there is still a percentage of surviving sperm with sublethal damage, causing the sperm cells' ability to survive after thawing to be limited and as a consequence there is a fall in fertility. It is well established that sperm from different domestic stallions vary significantly in cryosensitivity, this fact may be related to the effect of the cryoprotectant, as well as it may be related to the molecular size of the penetrating cryoprotectant and the cooling curve used. While glycerol remains the most common cryoprotectant for sperm, there are limiting factors for its use, including damage to the membrane through an osmotic effect, so amides have been studied with the aim of minimizing the effects caused by glycerol during cryopreservation process, as they present better cryoprotection of the sperm cell membrane. Thus, the purpose of this work was to evaluate different cryoprotectants in different refrigeration curves on the quality of equine semen. To this end, the study was carried out to evaluate the effect of cryoprotectants glycerol, methylformamide, dimethylformamide and dimethylacetamide in concentration at 5% in four refrigeration curves: $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, $0.25^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ with stabilization at 5°C for 15min and 75min in automatic refrigeration through Mini-Digitcool ZH 400. As a result, glycerol was the cryoprotectant that enabled better progressive motility as well as high mitochondrial potential. cryoprotectant caused more damage to the plasma membrane. On the other hand, dimethylformamide was the cryoprotectant that best protected the membrane of sperm cells after thawing. The curve that enabled better sperm viability in association with kinetics, mitochondrial potential and membrane integrity was the $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ curve.

Key-words: cryopreservation, cooling rate, stallion, sperm, cryoprotectants.

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O transporte do sêmen congelado é utilizado como uma alternativa para longas distâncias de forma prática e confiável (LOOMIS; GRAHAM, 2008), além de ser um banco seguro do material genético permitindo o uso dos garanhões após a morte (MOORE et al., 2005). Em relação à fertilidade, o sêmen congelado possui uma fertilidade reduzida em comparação ao sêmen fresco e o refrigerado (MOORE et al., 2005; LOOMIS; GRAHAM, 2008), sendo este um dos entraves da utilização do sêmen congelado por parte dos proprietários de cavalos (MOORE et al., 2005; AVANZI et al., 2015). A sua utilização gera maiores custos (LOOMIS; GRAHAM, 2008) e necessita de um acompanhamento mais preciso do ciclo da égua até o momento da ovulação (AVANZI et al., 2015).

A existência de uma variação individual na fertilidade do sêmen congelado entre garanhões (MANN; LUTWAK-MANN, 1981; BRINSKO et al., 2000; AKCAY et al., 2006; KARESKOSKI et al., 2010), demonstra a necessidade de investigar quais fatores estão relacionados com a melhora da viabilidade, nesse grupo de indivíduos que possuem baixa fertilidade após a criopreservação (KARESKOSKI, 2011; OLIVEIRA, 2016).

Tal fato pode estar relacionado à resistência da membrana espermática durante a congelação e descongelação. Em diferentes espécies os crioprotetores apresentam diferentes resultados pós-descongelação, entretanto na espécie bovina o glicerol (GLY) é o crioprotetor que confere uma melhor crioproteção espermática (PRIEN; IACOVIDES, 2016). Embora o GLY seja usado quase que universalmente para criopreservação de espermatozoides de garanhões (GRAHAM, 1996; ALVARENGA et al., 2005; MOORE et al., 2005; STZEIN et al., 2018), outros crioprotetores também têm sido utilizados, dentre eles: metilformamida (MF), dimetilformamida (DMF) e dimetilacetamida (DMA), mostrando resultados superiores durante a criopreservação (SQUIRES et al., 2004; GOMES et al., 2002; ALVARENGA et al., 2005; PUKAZHENTHI et al., 2014; OLDENHOF et al., 2017).

Os espermatozoides de diferentes garanhões variam significativamente a criosensibilidade (VIDAMENT et al., 1997; LOOMIS, 2001; RODRIGUEZ et al., 2011; PUKAZHENTHI et al., 2014; OLIVEIRA, 2016). Esse fato, pode estar relacionado a menor resistência a criopreservação em algumas raças de equino (GOMES et al., 2002; MEDEIROS, 2003; ALVARENGA et al., 2005; FREITAS, 2015), possivelmente

relacionado a composição do fosfolípido da membrana plasmática nesse grupo de animais (CABRERA et al., 2018).

O desafio principal na criopreservação dos gametas masculino em todas as espécies, inclusive em equinos, está relacionado ao fator tóxico desencadeado pelos crioprotetores durante a remoção da água da célula e minimizar o efeito do choque osmótico para os espermatozoides (BALL; VO, 2001; MEYERS, 2005; GLAZAR et al., 2009; PUKAZHENTHI et al., 2014).

Por outro lado, apesar do GLY ser o crioprotetor mais utilizado na criopreservação espermática, existem relatos da limitação do seu uso por causar danos à membrana através do efeito osmótico (GARCÍA et al., 2012). A busca por alternativas de agentes crioprotetores como as amidas (MF, DMF e DMA) estão sendo estudadas, ao longo de muitos anos (SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005; PUKAZHENTHI et al., 2014) estes agentes possuem estrutura molecular menores que a estrutura molecular do GLY, possivelmente, estas possam facilitar e acelerar a permeabilização da membrana espermática, permanecendo a célula exposta por um curto intervalo pré-refrigeração e diminuir assim o efeito tóxico aos espermatozoides (PUKAZHENTHI et al., 2014).

Entretanto, não foram encontrados estudos para determinar qual a melhor taxa de refrigeração para os diferentes crioprotetores (GLY, MF, DMF e DMA). Sendo assim, faz-se necessário esclarecer qual seria a melhor curva de refrigeração e como cada um deles se comportariam em termos de cinética e viabilidade espermática durante o processo de congelamento de espermatozoides equinos. Sendo assim, essa revisão tem por objetivo entender os princípios da criopreservação e os principais fatores que podem prejudicar as células espermáticas durante esse processo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico da criopreservação do sêmen

O primeiro relato sobre criopreservação de sêmen e inseminação artificial foi realizado na espécie canina, pelo padre e filósofo italiano Spallanzani (1776) descrito por Sztejn et al. (2018). Os espermatozoides foram as primeiras células em mamíferos a serem criopreservadas com sucesso a temperatura de -79°C , demonstrando a propriedade crioprotetora do GLY (SMITH, 1946 descrito por SZTEIN et al. (2018)). Anos depois foi relatado o nascimento do primeiro bezerro resultante da inseminação com sêmen

congelado segundo metodologia de Smith e Polge (POLGE; ROWSON, 1952). Após esses acontecimentos, tornou-se possível a criopreservação de sêmen em mamíferos. Nos equinos, a primeira prenhez relatada, utilizando sêmen congelado aconteceu no ano de 1957 (BARKER; GANDIER, 1957). No entanto, muitos aspectos sobre a congelação do sêmen equino ainda permanecem desconhecidos (KÚTVÖLGYI, 2012).

Paolo Mantegazza (1831-1910), um médico, cientista, antropólogo, político e entusiasta, teve seu principal feito ao resfriar espermatozoides de humano e rã a temperatura de -14 e -17°C (SZTEIN et al., 2018). Paolo Mantegazza em 1886 foi um visionário quando pensou na possibilidade de existência de um banco de sêmen, desta forma, ele chegou a seguinte conclusão: “se o sêmen do humano conseguiu permanecer inalterado por quatro dias em gelo, isso pode ser um grande passo para a ciência futura, no sentido de se melhorar as raças de bovinos e equinos, sem que esses animais sejam transportados, assim, poderá ser possível a realização da inseminação com o sêmen congelado desses animais”(SZTEIN et al., 2018).

Um importante filósofo e cientista Irlandês de nome Robert Boyle, publicou em 1662 o que entendemos hoje sobre a lei de Boyle, a qual demonstra que um gás estando em um recipiente adequado, quando recebe uma pressão maior o seu volume diminui proporcionalmente a pressão aplicada, revisado por Szein et al. (2018), esta observação então foi extrapolada para a criopreservação de células (LEIBO, 2004). Desta forma, em dias atuais sabe-se que os crioprotetores, classificados unicamente como polialcois na concentração de 1 a 1,5 Mol em uma solução, tem a capacidade de proteger as células durante a refrigeração, graças ao deslocamento da água do meio intracelular para o extracelular, evitando-se assim formação de cristais de gelo (MAZUR, 1963; MAZUR et al., 1972; SZTEIN et al., 2018). Para entendimento de forma mais compreensível, os crioprotetores possuem uma osmolaridade de $\sim 1200\text{mOsm/Kg H}_2\text{O}$, as células possuem uma osmolaridade de $\sim 300\text{mOsm/Kg H}_2\text{O}$, desta forma, para equilibrar a pressão externa, as células liberam água para o meio externo e incorpora os crioprotetores para equilibrar a pressão osmótica, conseqüentemente a célula reduz o seu volume ou encolhe (SZTEIN et al., 2018).

A primeira vez em que o GLY foi descrito como crioprotetor, assim como outros grandes achados da ciência aconteceu por acaso (POLGE et al., 1949). Tudo começou com uma garrafa rotulada erroneamente com laevulose (frutose) a qual, preservou a motilidade do sêmen de galos após mantida em freezer a -79°C . Ao desconfiar do real conteúdo da garrafa realizou-se uma análise na qual foi evidenciado a presença de 10%

de GLY e 1% de albumina, essa nada mais era que a solução de albumina de Meyer usada para fixar esfregaço antes da coloração (POLGE et al., 1949; SZTEIN et al., 2018). Essa descoberta marca o início de uma nova era na criopreservação, graças à adição do GLY é possível criopreservar espermatozoides de quase todas as espécies (SZTEIN et al., 2018).

As amidas foram mencionadas como sendo moléculas que tinham a capacidade de crioproteção das células biológicas em 1966 (NASH, 1966). A partir daí Nagase et al. (1972), utilizaram a formamida para criopreservação de espermatozoides de touros e concluíram uma boa criopreservação das células espermáticas. A acetamida demonstrou resultados eficientes na criopreservação de sêmen de coelhos (HANADA; NAGASE, 1980; DALIMATA; GRAHAM, 1997). Em garanhões as amidas foram usadas como agente crioprotetor em comparação ao glicerol pela primeira vez por Keith (1998), posteriormente o seu uso promoveu resultados satisfatórios na criopreservação dos gametas masculinos nesta espécie (ALVARENGA et al., 2000, ALVARENGA et al., 2002; PAPA et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002; SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005).

Conclusão

Como conclusão, o glicerol foi o crioprotetor que apresentou a melhor motilidade progressiva e mais alto potencial mitocondrial independente da curva utilizada. A metilformamida apresentou resultados intermediários de motilidade progressiva, alto potencial mitocondrial e estabilidade da membrana plasmática. A dimetilformamida mostrou ser o crioprotetor que conferiu maior proteção a membrana plasmática dos espermatozoides. A melhor curva para criopreservação foi $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, preservando assim a velocidade da cinética, estabilidade da membrana plasmática e o alto potencial mitocondrial independente do crioprotetor utilizado. Em adição, mais pesquisas com a criopreservação do sêmen de garanhões com a associação entre o crioprotetor com que confere mais alta velocidade de cinética e alto potencial mitocondrial com o crioprotetor que melhor protege a membrana das células na curva de refrigeração de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código do Financiamento 001. Os autores agradecem aos Haras parceiros Fazenda Caraúna (DVM responsáveis: Marcelo Pessoa, Bruno Avanzi e André Canizza) e Paint Collection (DVM responsável: Rafael Daia). As empresas Botupharma[®] LTDA e Guabi Nutrição e Saúde Animal. Aos cuidadores dos animais Edvaldo Torquato e Felipe Nunes.

715 **Referências**

716

717 [1] Medeiros ASL, Gomes GM, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA. Cryopreservation
718 of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 2002;58:273-6.

719 [2] Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. Amides as
720 cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci* 2005;89:105-13.

721 [3] Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: individual male variation in
722 cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim*
723 *Reprod Sci* 2008;105:119-28.

724 [4] Oliveira SN. Efeito da colheita fracionada sobre a cinética e viabilidade espermática
725 do sêmen refrigerado e congelado de garanhões. Botucatu, 2016. 103p. Dissertação
726 (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual
727 Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

728 [5] Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm
729 preservation. *Anim Reprod Sci* 2016;169:2-5.

730 [6] Oldenhof H, Bigalk J, Hettel C, Barros LO, Sydykov B, Bajcsy AC, Sieme H, Wolkers
731 WF. Stallion Sperm Cryopreservation Using Various Permeating Agents: Interplay
732 Between Concentration and Cooling Rate. *Biopreserv Biobank* 2017;15:1-10.

733 [7] Squires EL, Keith SL, Graham K. Evaluation of alternative cryoprotectants for
734 preserving stallion spermatozoa, *Theriogenology* 2004;62:1056-65.

735 [8] Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell’Aqua, Jr. JA, Zahn FS, Alvarenga MA.
736 Freezing of stallion epididymal sperm. *Anim Reprod Sci* 2008;107:293-301.

737 [9] Mazur P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the
738 Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 1963;47:347-69.

739 [10] Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*
740 1984;247:125-42.

741 [11] Dell’Aqua Jr. JA, Papa FO, Alvarenga MA, Zahn FS. Effect of packing systems and
742 thawing temperature on spermatoc parameters and fertility rate of frozen equine semen.
743 *Rev Bras Reprod Anim* 2001;25:458-60.

744 [12] Vidament M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen
745 stallion semen. *Anim Reprod Sci* 2005;89:115-36.

746 [13] Papa FO, Zahn FS, Dell’Aqua Jr. JÁ, Alvarenga MA. Utilização do diluente MP50
747 para a criopreservação do sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim* 2002;26:184-7.

- 748 [14] Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA. Improvement of
749 stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga
750 Marchador breed. *Theriogenology* 2002;58:277-9.
- 751 [15] Salazar Jr., JL, Teague SR, Love CC, Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD. Effect
752 of cryopreservation protocol on post thaw characteristics of stallion sperm.
753 *Theriogenology* 2011;76:409-18.
- 754 [16] Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H. Optimal concentrations
755 of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for
756 freezing. *Anim Reprod Sci* 2011;125:112-8.
- 757 [17] Oldenhof H, Friedel K, Akhoondi M, Gojowsky M, Wolkers WF, Sieme H.
758 Membrane phase behaviour during cooling of stallion sperm and its correlation with
759 freezability. *Mol Membr Biol* 2012;29:95-106.
- 760 [18] Gibb Z, Morris, LHA, Maxwell WMC, Grupen CG. Dimethyl formamide improves
761 the post thaw characteristics of sex-sorted and nonsorted stallion sperm. *Theriogenology*
762 2013;79:1027-33.
- 763 [19] Oldenhof H, Akhoondi M, Sieme H, Wolkers WF. Use of Fourier transform infrared
764 spectroscopy to determine optimal cooling rates for cryopreservation of cells. *Biomed*
765 *Spectrosc Imaging* 2013;2:83-90.
- 766 [20] Pukazhenthi BS, Johnson A, Guthrie HD, Songsasen N, Padilla LR, Wolfe BA, Silva
767 MC, Alvarenga MA, Wildt DE. Improved sperm cryosurvival in diluents containing
768 amides versus glycerol in the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*). *Cryobiology*
769 2014;68:205-14.
- 770 [21] Moraes CR, Meyers S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions.
771 *Anim Reprod Sci* 2018;194:71-80.
- 772 [22] Maziero RRD, Guaitoloni CRF, Guasti PN, Monteiro GA, Martins I, Silva JPM,
773 Crespilho AM, Papa FO. Effect of using two cryopreservation methods on viability and
774 fertility of frozen stallion sperm. *J Equi Vet Sci* 2019;72:37-40.
- 775 [23] Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DL, McCue PM, Bruemmer JE.
776 Cooled and Frozen Stallion Semen. Fort Collins: Animal Reproduction and
777 Biotechnology laboratory, 1999.
- 778 [24] Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Sperm membrane behaviour during cooling and
779 cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 2015;50:20-26.

- 780 [25] Wolkers WF, Oldenhof H, Tang F, Han J, Bigalk J, Sieme H. Factors Affecting the
781 Membrane Permeability Barrier Function of Cells during Preservation Technologies.
782 *Langmuir* 2019;35:7520-8.
- 783 [26] Oldenhof H, Heutelbeck A, Blasse AK, Bollwein H, Martinsson G, Wolkers WF,
784 Sieme H. Tolerance of spermatozoa to hypotonic stress: role of membrane fluidity and
785 correlation with cryosurvival. *Reprod Fert Develop* 2015;27:285-93.
- 786 [27] Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm:
787 what we ask them to survive, *J Androl* 1990;11:73-88.
- 788 [28] Amann RP, Graham JK. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL. *Equine*
789 *reproduction*. Philadelphia: Saunders. 1993:715-45.
- 790 [29] Mazur P. (2004). Principles of cryobiology. In 'Life in the Frozen State'. (Eds B. J.
791 Fuller, N. L. Lane and E. E. Benson.) pp. 3–65. (CRC Press LLC: Boca Raton, FL.)
- 792 [30] Kayser JP, Amann RP, Shideler RK, Squires EL, Jasko DJ, Pickett BW. Effects of
793 linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*
794 1992;38:601-14.
- 795 [31] Ball BA, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble
796 cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane
797 potential. *J Androl* 2001;22:1061-9.
- 798 [32] Zúccari CESN. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula
799 espermática equina. Botucatu, 1998. 121p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina
800 Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- 801 [33] Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine*
802 *Pract* 1996;12:131-47.
- 803 [34] Akhoondi M, Oldenhof H, Stoll C, Sieme H, Wolkers WF. Membrane hydraulic
804 permeability changes during cooling of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*
805 2011;1808:642-8.
- 806 [35] Rodriguez AM, Ferrusola CO, Macias B, Morrell JM, Rodriguez-Martinez H, Tapia
807 JA, Peña FJ. Freezing stallion sperm with the new Cáceres extender improved post thaw
808 sperm quality and diminishes stallion-to-stallion variability. *Anim Reprod Sci*
809 2011;127:78-83.
- 810 [36] Darr CR, Cortopassi GA, Datta S, Varner DD, Meyers SA. Mitochondrial oxygen
811 consumption is a unique indicator of stallion spermatozoa health and varies with
812 cryopreservation media. *Theriogenology* 2016;86:1382-92.

- 813 [37] Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide
814 in combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology* 1997;49:831-41.
- 815 [38] Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhaus FW. Prevention of
816 osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum*
817 *Reprod* 1995;10:1109-22.
- 818 [39] García MB, Moran MA, Fernandez GL, Ferrusola OC, Rodriguez MA, Bolanos
819 GJM, Silva BCM, Martinez RMH, Tapia JA, Pena FJ. The mitochondria of stallion
820 spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic induced stress: role of
821 c-Jun Nterminal Kinase (JNKs) pathway. *J Androl* 2012;33:105-13.
- 822 [40] Alvarenga MA, Keith SL, Graham JK, Landim-Alvarenga FC, Squires EL.
823 Alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. *Proc XI Inter Congr Animal*
824 *Reprod AI*, 2000:73.
- 825 [41] Wu Z, Zheng X, Luo Y, Huo F, Dong H, Zhang G, Yu W, Tian F, He L, Chen J.
826 Cryopreservation of stallion spermatozoa using different cryoprotectants and
827 combinations of cryoprotectants. *Anim Reprod Sci* 2015;163:75-8.
- 828 [42] Carneiro JAM, Canisso IF, Bandeira RS, Scheeren VFC, Freitas-Dell'Aqua CP,
829 Alvarenga MA, Papa FO, Dell'Aqua Jr. JA. Effects of coenzyme Q10 on semen
830 cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability.
831 *Anim Reprod Sci* 2018;192:107-18.
- 832 [43] Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by
833 heparin. *Biol Reprod* 1988;38:1171-80.
- 834 [44] Sieme H, Harrison RAP, Petrunkina AM. Cryobiological determinants of frozen
835 semen quality, with special reference to stallion. *Anim Reprod Sci* 2008;107:276-92
- 836 [45] Cabrera T, Ramires-Neto C, Belaz KRA, Freitas-Dell'Aqua CP, Zampieri D, Tata
837 A, Eberlin MN, Alvarenga MA, Souza FF. Influence of spermatozoal lipidomic profile
838 on the cryoresistance of frozen spermatozoa from stallions. *Theriogenology*
839 2018;108:161-6.
- 840 [46] Love CC. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of
841 stallions. *Theriogenology* 2011;76:547-57.
- 842 [47] Barrier-Battut I, Kempfer A, Lemasson N, Chevrier L, Camugli S. Prediction of the
843 fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted
844 motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology*
845 2017;97:186-200.

- 846 [48] Santiani A, Vargas A, Vargas S, Gallo S, Ruiz L, Orozco V, Rosemberg M.
847 Cryopreservation of Peruvian Paso horse spermatozoa: dimethylacetamide preserved an
848 optimal sperm function compared to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol.
849 *Andrologia* 2016;1:1-3.
- 850 [49] Bianchi I, Calderam K, Maschio EF, Madeira EM, Ulguim R, Corcini CD,
851 Bongalhardo DC, Corrêa EK, Lucia Jr. T, Deschamps JC, Corrêa MN. Evaluation of
852 amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology*
853 2008;69: 632-8.
- 854 [50] Pinho RO, Lima DMA, Shiomi HH, Siqueira JB, Silva HT, Lopes PS, Guimarães
855 SEF, Guimarães JD. Effect of different cryo-protectants on the viability of frozen/thawed
856 semen from boars of the Piau breed. *Anim Reprod Sci* 2014;146:187-92.
- 857 [51] Mosca F, Zaniboni L, Sayed AA, Madeddu M, Iaffaldano N, Cerolini S. Effect of
858 dimethylacetamide and N-methylacetamide on the quality and fertility of frozen/thawed
859 chicken semen. *Poult Sci* 2019;98:6071-7.
- 860 [52] Bittencourt RF, Oba E, Biscarde CEA, Azevedo HC, Bittencourt MV, Menezes
861 GFO, Lima AS, Fuchs KM, Ribeiro-Filho AL. Dimethylacetamide and trehalose for ram
862 semen cryopreservation. *Cryobiology* 2018;85:1-6.
- 863 [53] Fahy GM, Lilley TH, Linsdell H, Douglas MSJ, Meryman HT. Cryoprotectant
864 toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms.
865 *Cryobiology* 1990;27:247-68
- 866 [54] Meyers SA. Spermatozoal response to osmotic stress, *Anim Reprod Sci* 2005;89:57-
867 64.
- 868 [55] Layek SS, Mohanty TK, Kumaresan A, Parks JE. Cryopreservation of bull semen:
869 Evolution from egg yolk based to soy bean based extenders. *Anim Reprod Sci*
870 2016;172:1-9.
- 871 [56] Nash T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect
872 living cells against damage due to freezing and thawing. In: Meruman HT. *Cryobiology*.
873 New York: Academic Press., 1966:179-220.
- 874 [57] Rodriguez AM, Silva CB, García BM, Bolanos JMG, Tapia JA, Aparicio IM,
875 Ortega-Ferrusola C, Pena FJ. Dimethylformamide Improves the In vitro Characteristics
876 of Thawed Stallion Spermatozoa Reducing Sublethal Damage. *Reprod Domest Anim*
877 2012:1-8.

- 878 [58] Glazar AI, Mullen SF, Liu J, Benson JD, Critser JK, Squires EL, Graham JK.
879 Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion
880 spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology* 2009;59:201-6.
- 881 [59] Kundu CN, Chakraborty J, Dutta P, Bhattacharyya D, Ghosh A, Majumder GC.
882 Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined
883 medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 2000;40:117-25.
- 884 [60] Hay MA, King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL. Effects of cooling,
885 freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J Reprod Fertil*
886 1997;51:99-108.
- 887 [61] Cook NL, Masterson KR, Battaglia D, Beck R, Metcalf ES. Dimethyl sulfoxide and
888 glycerol as cryoprotectant agents of stallion semen: effects on blastocyst rates following
889 intracytoplasmic sperm injection of IVM equine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 2020;32:253-
890 8.
- 891 [62] Van Gestel RA, Brewis IA, Ashton PR, Brouwers JF, Gadella BM. Multiple proteins
892 present in purified porcine sperm apical plasma membranes interact with the zona
893 pellucida. *Mol Hum Reprod* 2007;13:445-54.
- 894 [63] Gadella BM. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim*
895 *Reprod Sci* 2008;107:229-36.
- 896 [64] Ortega-Ferrusola C, Sotillo-Gala Y, Varela-Fernandez E, Gallardobolanos JM,
897 Gonzalez-Fernandez L, Tapia JA, Pena FJ. Detection of apoptosis like changes during
898 the cryopreservation process in equine sperm. *J Androl* 2008;29:213-21.
- 899 [65] O'Connell M, McClure N, Lewis S. The effects of cryopreservation on sperm
900 morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod* 2002;17:704-9.
- 901 [66] Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 1999;283:1488-
902 93.
- 903 [67] Cecilia B, Valdivia P, Rodriguez-Flores L, Gomez-Puyou MT, Lotina-Hennsen B.
904 Inhibition of photophosphorylation and electron transport by NJ-dimethylformamide.
905 *Biochim Biophys* 1991;41:169-74.
- 906 [68] Hammerstedt RH Hay SR. Effect of incubation temperature on motility and cAMP
907 content of bovine sperm. *Arch Biochem Biophys* 1980;199:427-37.