



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. Esquematização 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 crio-sensibilidade, 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 Sztein 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, consequentemente 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).

2.2. Estrutura do espermatozoide equino

O espermatozoide é a célula responsável por carregar o material genético do macho e tem um papel importante na fertilização do oócito, dentre milhões de células que são ejaculadas, apenas uma irá cumprir a missão final que é a fertilização (VARNER et al., 2015). Esta célula, na maioria das vezes é descrita como uma célula simples, na realidade, é extremamente complexa e adaptável para realizar sua principal tarefa que é a fertilização, exigindo para tanto uma série de funções coordenadas a níveis celulares e moleculares para cumprir a sua função (VARNER et al., 2015).

Morfológicamente os espermatozoides dos equinos se diferenciam das demais espécies por apresentar cabeça assimétrica, frequente inserção de cauda abaxial, pequeno volume de acrossoma e bordo apical com dimensões reduzidas (MASSANYI, 1995). Esta célula é completamente envolta por uma membrana plasmática e dividida em três distintos compartimentos: cabeça, peça intermediária e cauda, cada uma dessas estruturas desempenham um papel importante para o seu funcionamento (AMANN; PICKETT, 1987; AMANN; GRAHAM, 1993; BRITO, 2007; VARNER et al., 2015; KRAPF, 2018).

A cabeça é formada pelo acrossoma, uma lâmina pós-acrossomal e pelo núcleo; os dois terços anteriores do núcleo (porção cranial) são cobertos pelo acrossoma, que é uma vesícula especializada formada a partir de uma membrana de dupla camada de fosfolipídios que contém enzimas hidrolíticas (hialuronidase, pró-acrosina/acrosina e lipases) essenciais para penetração do espermatozoide na zona pelúcida do oócito (BRITO, 2007). A lâmina pós-acrossomal é composta por uma alta densidade de elétrons que cobre a cauda, uma porção do núcleo e o anel caudal (BRITO, 2007). O segmento equatorial do acrossoma não contém enzimas nem desempenha função de reação do acrossoma, enquanto a membrana plasmática desta região se funde com o oócito, desta forma, a lâmina pós-acrossomal parece ter uma função secundária no momento da ligação do espermatozoide a membrana plasmática com oócito (ZÚCCARI, 1998).

O formato da cabeça do espermatozoide no garanhão é ligeiramente elíptico, achatada em um plano dorso-ventral mais espessa na porção posterior da cabeça do que na parte apical (Figura 1) (VARNER et al., 2000). O núcleo ocupa a grande parte da cabeça, nele está o material genético sob a forma de ácido desoxirribonucleico (DNA) altamente condensado (AMANN; PICKETT, 1987; BRITO, 2007; VARNER et al., 2015), sendo formado por um envelope nuclear de dupla camada fosfolipídica (KÚTVÖLGYI, 2012). A base do núcleo termina com a fossa de implantação, onde a camada nuclear externa de dupla membrana envelope e engrossa para formar a placa basal, que fornece a fixação da cabeça ao *capitulum* do pescoço (BRITO, 2007; KÚTVÖLGYI, 2012). A cabeça das células espermáticas possui cinco membranas na região apical sendo externamente revestida pela membrana plasmática, abaixo encontram-se as membranas acrossomais externa e interna, seguidas pela dupla membrana nuclear (BRITO, 2007).

A região entre a cabeça e o pescoço é definida por um anel posterior e corresponde ao local de fixação do plasmalema com o envelope nuclear na base da cabeça (BRITO, 2007). A posição da fossa de implantação é frequentemente abaxial no garanhão, portanto, a posição abaxial da cauda é considerada normal em espermatozoides equinos, resultando em movimento curvilíneo do espermatozoide (KÚTVÖLGYI, 2012).

Abaixo do *capitulum* estão as colunas estriadas sendo que a sua porção final se estende até o início das fibras externas densas, assim como, o centríolo proximal encontra-se nesta mesma região (BIELANSKI; KACZMARSKI, 1979), em associação com a peça de conexão, constitui o local de início do movimento do flagelo (AMANN; GRAHAM, 1993).

A peça intermediária é caracterizada pela presença do axonema, um conjunto de fibras densas externa sobrepondo o arranjo de mitocôndrias que ficam dispostas elicoidalmente (VARNER et al., 2015). Logo abaixo da bainha mitocondrial, ponto onde a peça principal se une a peça intermediária, encontram-se nove fibras densas, estruturas fibrosas semelhantes à queratina (VARNER et al., 2015). O axonema localizado na porção central da peça intermediária apresenta um par central de microtúbulos, principalmente da família das tubulinas, circundado por um anel de nove pares (9+2), cada um dos nove pares de microtúbulos consiste em uma subunidade “A” cilíndrica composta por 13 protofilamentos e uma subunidade “B” que é em formato de “C”, composta de 10-11 protofilamentos, as unidades “A” servem de âncora para os braços externos de dineínas que possuem adenosina trifosfato (ATP) e gera a força necessária para movimentar o axonema e conseqüentemente o flagelo através de um ciclo de separação entre subunidades “A e B” (AMANN; GRAHAM, 1993; VARNER et al., 2015).

O *annulos* marca o final da peça intermediária, abaixo dele pode-se observar a primeira camada de estrias de bainha fibrosa com suas colunas longitudinais dorsal e ventral, ambas de caráter proteico, as fibras densas e o axonema, essas estruturas são revestidas externamente pela membrana plasmática (VARNER et al., 2015).

A cauda do espermatozoide é dividida em peça intermediária, peça principal e peça final. A peça intermediária é a parte mais larga da cauda, ela é formada pelo axonema rodeado pelas nove fibras densas externas e a bainha mitocondrial, estende-se desde a extremidade caudal do pescoço até o anel. A bainha mitocondrial consiste em mitocôndrias dispostas helicoidalmente, que contém enzimas e cofatores para produção de ATP. O axonema e as fibras densas da peça intermediária continuam através da peça principal, mas as fibras densas tornam-se mais estreitas e terminam em diferentes níveis na peça principal distal. A peça principal é a parte mais longa do espermatozoide, esta contém o axonema, as fibras densas e uma bainha fibrosa (AMANN; GRAHAM, 1993; VARNER et al., 2015). Os microtúbulos do axonema se estendem da região do pescoço através da peça central e peça principal para a peça final, onde eles terminam em sítios ligeiramente diferentes. As fibras densas e a bainha fibrosa não possuem contato; no entanto, eles fornecem rigidez e flexibilidade ao mesmo tempo para o movimento flagelar. A peça final é o segmento terminal curto da cauda contendo apenas o axonema ou microtúbulos individuais que estão rodeados pela membrana plasmática (AMANN; GRAHAM, 1993; BRITO, 2007; KÚTVÖLGYI, 2012).

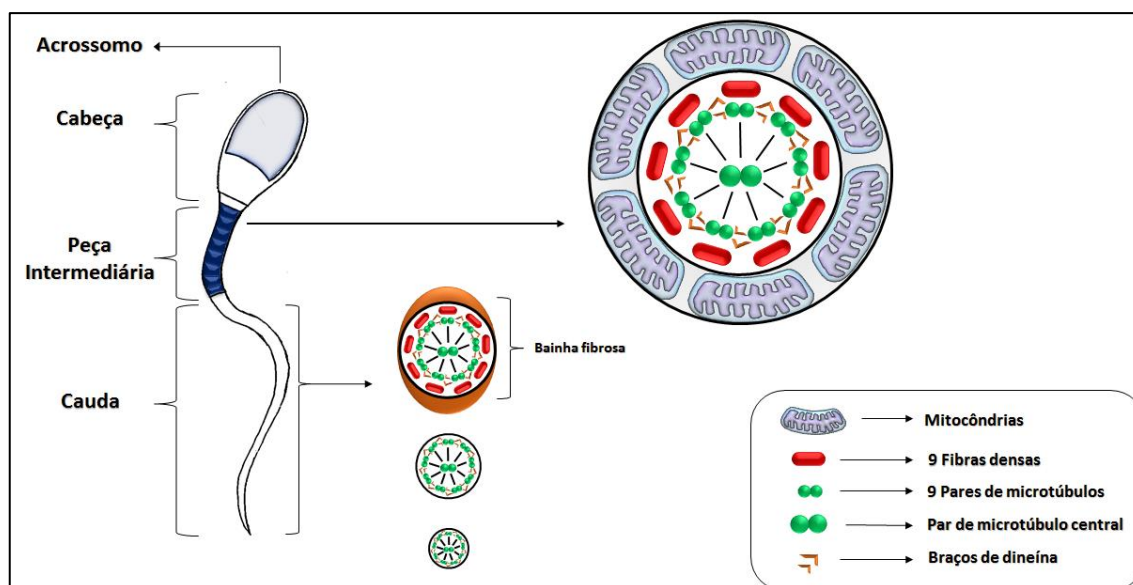


FIGURA 1. Estrutura da célula espermática. Fonte: SILVA (2016).

2.3. Membrana plasmática do espermatozoide

A membrana plasmática das células não é estática, todos os componentes, lipídios e proteínas estão em constante movimentação (AMANN; PICKETT, 1987). A mudança de posição de uma molécula entre duas superfícies de membrana é denominada difusão transversal ou *flip-flop*, enquanto a difusão no mesmo plano da membrana é denominada difusão lateral (STRYER, 1992). Normalmente a membrana plasmática permanece no estado de líquido cristalino transparente e fluido em condições fisiológicas, este estado é modificado durante a refrigeração, os lipídios passam por uma fase de transição onde os mesmos encontram-se em estado semi-sólido ou estado de gel, nesta condição não há movimento de lipídios e proteínas de membrana (AMANN; PICKETT, 1987). A fase de gel pode causar ruptura da membrana e consequentemente, permitir que os íons se movam de dentro para fora ou de fora para dentro ou ainda causar a inibição das proteínas da membrana (AMANN; GRAHAM, 1993; SQUIRES et al., 1999).

A membrana plasmática circunda totalmente o espermatozoide, tem como característica glicoproteínas e lipídios regionais específicos, principalmente fosfolipídios e constituintes de colesterol (AMANN; PICKETT, 1987; YANAGIMACHI, 1994; SCOTT, 1973). Os lipídios são arranjados como uma bicamada de fosfolipídios, as proteínas se misturam com os lipídios como integrante ou proteínas periféricas (YANAGIMACHI 1994; SCOTT, 1973). A proporção de colesterol em razão aos

fosfolipídios e a natureza dos fosfolipídios determinam a flexibilidade da membrana, que é fluida à temperatura corporal (HAMMERSTEDT et al., 1990) (Figura 2).

Células eucarióticas, assim também como suas organelas, são envolvidas por uma membrana formada por uma bicamada fosfolipídica, tendo em sua composição moléculas como os ácidos graxos saturados e insaturados ligados a grupamentos fosfato (ROBERTSON, 1981). Esta estrutura constitui uma barreira de permeabilidade altamente seletiva, de forma que, os componentes moleculares assim como os iônicos do meio intracelular são regulados pela bomba de transporte de moléculas. A passagem de substâncias do meio intracelular para o meio extracelular se dá através de canais específicos de acordo com os estímulos recebidos (ZÚCCARI, 1998).

A estrutura, caracterizada pela bicamada de fosfolipídios, garante às membranas a formação de extremidades polares que são hidrofílicas, assim como, um centro apolar e hidrofóbico, conferindo às células e organelas impermeabilidade à maioria dos solutos polares (AMANN; PICKETT, 1987; OLIVEIRA et al., 2013; NELSON; COX, 2014). Também estão presentes nas membranas algumas proteínas que podem ser integrais ou periféricas, atuam como bombas de transporte de substâncias entre o meio interno e externo, atividade metabólica com função enzimática, reconhecimento celular e permitem ligações entre células (ROBERTSON, 1981; OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, elas são responsáveis pela preservação da homeostase celular e de suas organelas, condição fundamental para sobrevivência e manutenção do potencial de fertilização das células espermáticas, sendo a integridade funcional das membranas dos espermatozoides considerada crucial para os processos de capacitação, reação acrossomal e adesão ao oócito (FLESCH; GADELLA, 2000).

A membrana plasmática das células espermáticas dos gananhões contém três classes principais de lipídios em uma proporção aproximada de 57% de fosfolipídios, 37% de colesterol e 6% de glicolipídios (YANAGIMACHI, 1994). Os fosfolipídios, são os principais componentes lipídicos e são compostos de ácidos graxos poliinsaturados em particular, ácido docosahexaenóico (DHA; 22: 6 n-3, um ácido graxo ômega-3) e ácido docosapentaenóico (DPA; 22: 5n-6, um ácido graxo ômega-6) (KÚTVÖLGYI, 2012).

A proporção entre colesterol e fosfolipídios esta diretamente relacionada a resistência ao processo de criopreservação (AMANN; PICKETT, 1987). Em gananhões esta relação é de 0,36, valores mais baixos são encontrados em suíno (0,26) e galinha (0,30) e, mais altos em bovino (0,45) (PARKS; LYNCH, 1992) e coelho (0,88) (WATSON, 1981).

A fluidez da membrana plasmática depende da temperatura, de seu conteúdo de colesterol de sua composição lipídica, além disso o comprimento e o grau de insaturações da cadeia de ácidos graxos. A rigidez é possível graças à presença de ácidos graxos saturados de caudas hidrocarbonadas retas que interagem umas com as outras. Por outro lado, quando há presença de uma dupla ligação, a estrutura da cauda torna-se dobrada e dificulta a organização entre as cadeias de ácidos graxos (ALBERTS et al., 1989). Essas características permitem a passagem da fase de transição com temperaturas menores em comparação com cadeias longas e saturadas (DARNELL et al., 1990). A fase de transição ocorre em função da mudança de temperatura, caracterizada como a reorganização das cadeias hidrocarbonadas, que por sua vez estando desorganizada passa a se organizar e tem como característica um estado físico similar ao gel (STRYER, 1992), essa mudança de fase, é consequência de alterações na forma das moléculas de fosfolipídios induzidas pela refrigeração, possivelmente o evento que ocorrem corresponde ao alongamento das cadeias de ácido graxos permitindo que as moléculas fiquem com suas cadeias estreitamente fechadas em paralelo, sendo assim, os fosfolipídios não podem se movimentar de maneira aleatória (AMANN; PICKETT, 1987), nos equinos essa fase acontece a uma temperatura de 30°C e 10°C (OLDENHOF et al., 2012; OLDENHOF et al., 2015; WOLKERS et al., 2019).

Durante a refrigeração, a alteração da orientação dos lipídios, podem modificar a estabilidade da membrana ou induzir um rearranjo (fase hexagonal-II) das moléculas, formar pontos frágeis, promover mudança na membrana plasmática, podendo acarretar em excessiva permeabilidade e como consequência sua ruptura (AMANN; GRAHAM, 1993). No processo de congelação, aquelas membranas que predominam lipídios de cadeias curtas e com maior número de insaturações, possuem uma menor resistência, este acontecimento ocorre por conta das caudas hidrocarbonadas interagirem e as duplas ligações dificultarem seu agrupamento (ALBERTS et al., 1989).

Com relação às proteínas de membrana, estas podem ser integrantes ou periféricas, classificadas quanto a sua dissociabilidade (AMANN; PICKETT, 1987). Por sua vez, as integrantes interagem com as cadeias hidrocarbonadas dos lipídios, se mantêm ancoradas e somente são liberadas na presença de outras moléculas que competem com as interações não polares. Por outro lado, grande parte das proteínas periféricas estão ligadas à superfície das proteínas integrantes do lado extracelular (DARNELL et al., 1990).

As proteínas intracelulares estão susceptíveis a injúrias durante o processo de refrigeração, devido à redução da atividade enzimática, da mesma forma as proteínas envolvidas no transporte de substâncias através da membrana também apresentam queda da atividade a baixas temperaturas (AMANN; PICKETT, 1987). Isso acontece possivelmente devido a alguns fatores como o decréscimo da cinética da molécula em baixa temperatura, alteração do pH da fração aquosa intracelular e extracelular, alteração na carga elétrica da proteína, mudança da interação lipídio-proteína graças aos lipídios que tendem a fase hexagonal-II serem removidos das proximidades das proteínas, consequentemente há uma redução na mobilidade lateral pela membrana quando os lipídios estão na fase de gel e por fim desnaturação irreversível das proteínas (AMANN; GRAHAM, 1993).

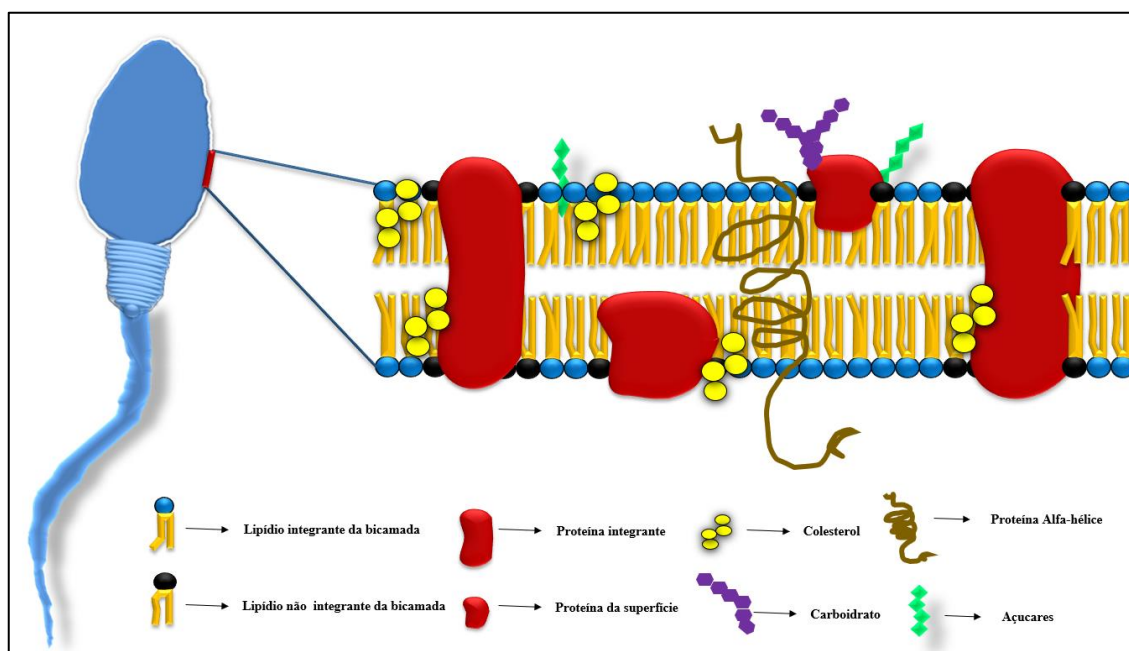


FIGURA 2. Bicamada fosfolipídica da membrana plasmática do espermatozoide na forma fisiológica. (Arquivo Pessoal)

2.4. Metabolismo das células espermáticas

A glicose é a principal fonte de energia para as células espermática dos equinos (VARNER; JOHNSON, 2007), desta forma, uma molécula de glicose após passar por várias reações principalmente na mitocôndria, será convertida em 6 moléculas de dióxido de carbono (CO_2), seis moléculas de água (H_2O) e 32 moléculas de ATP (NELSON; COX, 2014).

As mitocôndrias estão localizadas na peça intermediária dos espermatozoides, ficam situadas em forma de espiral ao redor as fibras densas, são organelas membranosas responsáveis pela produção de energia necessária para o movimento celular, sua principal fonte energética é a degradação da glicose (BRITO, 2007). O mecanismo de geração de energia submete a glicose e os subprodutos a cinco etapas principais, que são: glicólise, complexo piruvato-desidrogenase, ciclo do ácido cítrico, cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. Essa energia é oferecida na forma de ATP, que é o combustível celular, mas, funções adicionais incluem a geração de espécies reativas de oxigênio, envolvimento em algumas formas de apoptose celular, regulação do cálcio na matriz citoplasmática e mitocondrial, síntese e catabolismo de metabolitos dentre outros (AMARAL et al., 2013; NELSON; COX, 2014).

Estas organelas são anatomicamente definidas como tendo duas membranas: uma membrana mitocondrial externa, a qual envolve a membrana mitocondrial interna que produz energia, estas são separadas por um espaço intermembranar (MANNELLA, 2006; AMARAL et al., 2013; MORAES; MEYERS, 2018). A membrana externa é permeável a pequenas moléculas e a íons que transitam livremente através das aquaporinas e a membrana interna é seletiva, impermeável a maioria das moléculas e até mesmo a íons (NELSON; COX, 2014) (Figura 3).

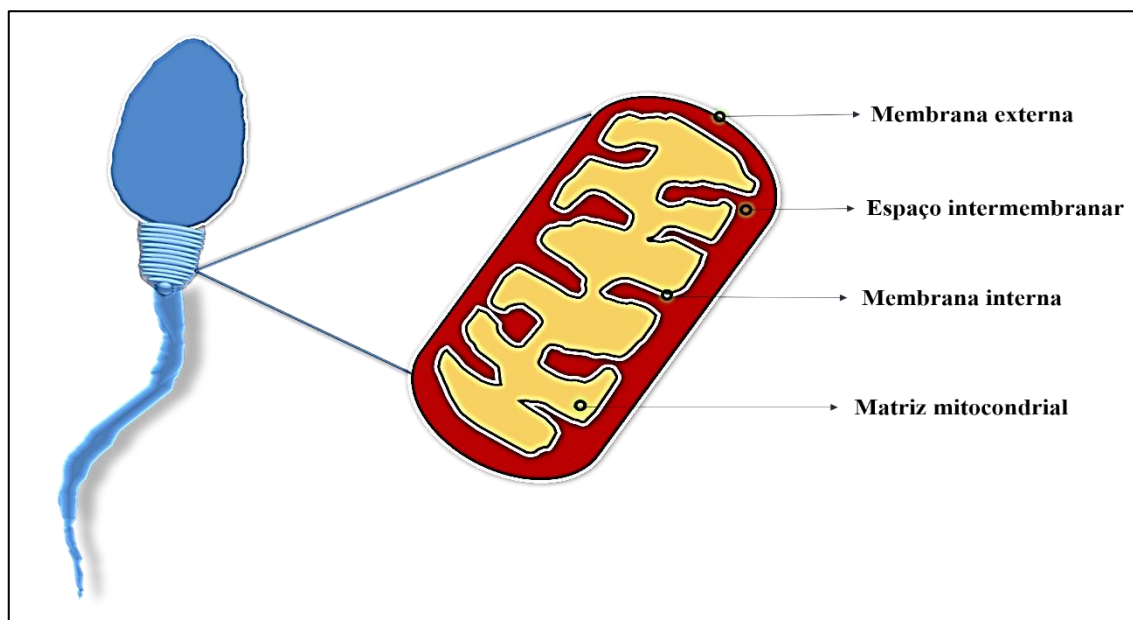


FIGURA 3. Mitocôndria: Localização e disposição dos compartimentos mitocondriais. (Arquivo Pessoal)

As mitocôndrias participam de muitos processos cruciais nas células eucarióticas, sendo a mais conhecida a produção de ATP por fosforilação oxidativa, precedida pela geração de portadores de elétrons reduzidos, tanto no citoplasma (via glicólise) quanto no mitocondrial matriz (onde ocorre o ciclo de Krebs e a oxidação da maioria dos ácidos graxos).

A fosforilação oxidativa é a principal via produtora de energia na célula que ocorre nas mitocôndrias (MORAES; MEYERS, 2018). A cadeia de transporte de elétrons é orquestrada por reações que ocorrem em vários complexos enzimáticos, isso acontece em toda a membrana interna mitocondrial, essa possui cinco proteínas denominadas de complexos que são responsáveis pelo transporte de três elétrons dentro da cadeia através NADH-Desidrogenase (complexos I), succinato desidrogenase (complexo II), citocromo bc_1 (complexo III), citocromo oxidase (complexo IV) e ATP-sintase (complexo V), resultando em energia na forma de H^+ para a síntese de ATP (HAGERHALL, 1997; RAHA; ROBINSON, 2000) (Figura 4).

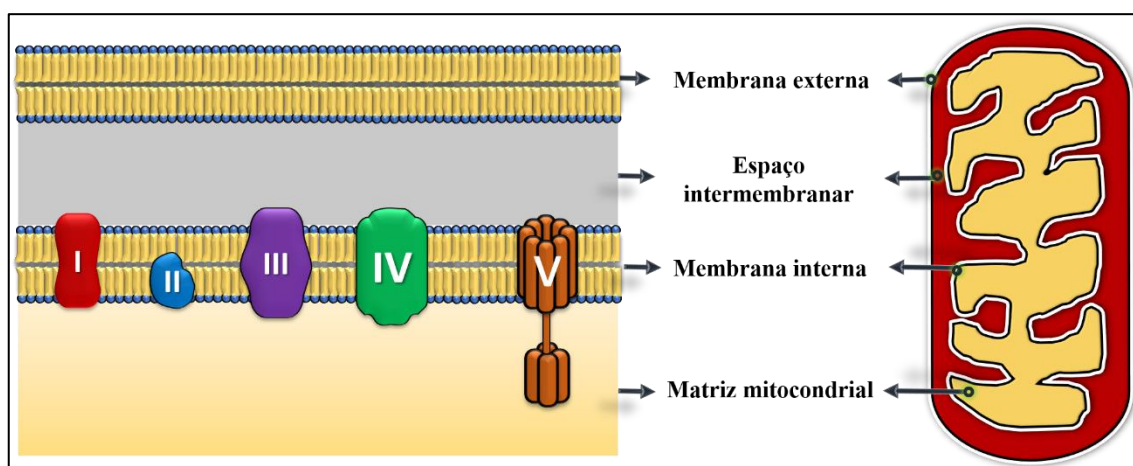


FIGURA 4. Disposição dos complexos enzimáticos NADH-Desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), citocromo bc_1 (complexo III), citocromo oxidase (complexo IV) e ATP-sintase (complexo V), responsáveis pela cadeia de transporte de elétron na mitocôndria. (Adaptado de SILVA, 2016)

Os complexos I, III e IV, bombeiam prótons para o espaço intermembranar, contribuindo para o gradiente de prótons, os complexos I e III são as principais subunidades produtoras de espécie reativa de oxigênio sendo liberado na matriz a partir de ambos os complexos, bem como do espaço intermembranar do complexo III, o oxigênio é reduzido à água no complexo IV, que é a principal etapa que consome oxigênio da respiração celular (HAGERHALL, 1997; MORAES; MEYERS, 2018). Isto é possível

graças a diferença de cargas existente entre o espaço interno e externo da membrana, havendo uma tendência de migração dos H^+ do espaço intermembranas (SARASTE, 1999; BERTRAM et al., 2006). O complexo V conhecido também ATP-sintase, é responsável pela síntese de ATP, utilizando a força motora de prótons criada na membrana mitocondrial interna (MORAES; MEYERS 2018).

No término da fosforilação oxidativa, são geradas 28 moléculas de ATP a partir dos dez NADH e dois $FADH_2$ provenientes das etapas anteriores, resultando na produção de 32 ATPs após completa metabolização da glicose (NELSON; COX, 2014) (Figura 5).

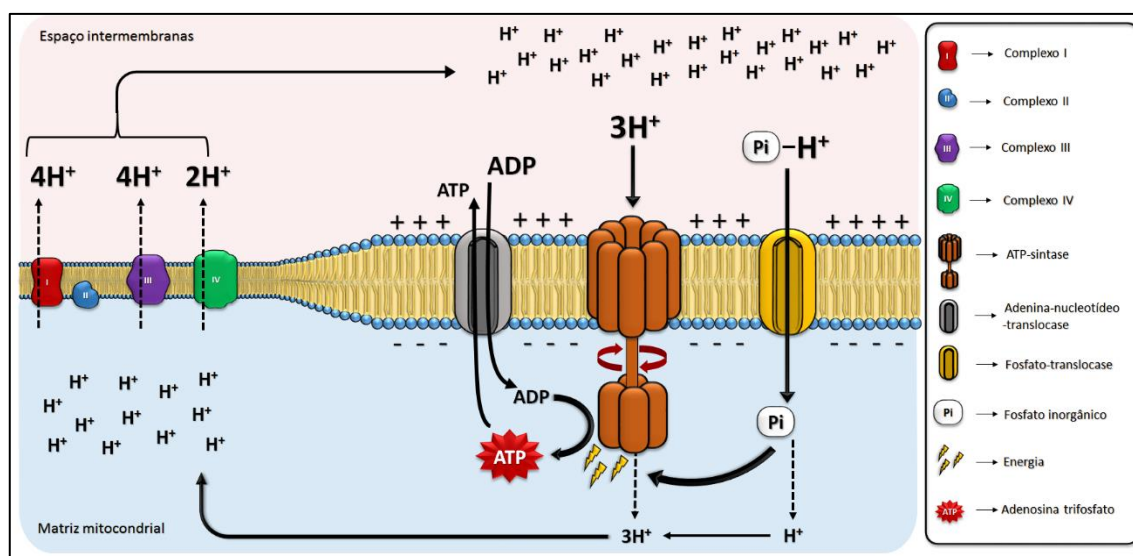


FIGURA 5. Esquemática da cadeia de transporte de elétrons, formação da adenosina trifosfato (ATP) durante a fosforilação oxidativa. (Fonte: SILVA, 2016)

2.5. Crioprotetores

No processo de criopreservação, os espermatozoides são submetidos à refrigeração e posteriormente a congelação, dessa forma, há formação de cristais de gelo extra e intracelular; em outras células o gelo intracelular não é o principal causador de morte celular, esse fato é diferente nas células espermáticas (MORRIS et al., 2007). Sendo assim, durante no processo de criopreservação do sêmen equino são adicionados os crioprotetores (TALVIS, 2018).

Os crioprotetores são compostos químicos que fazem parte de diluentes de congelação com a finalidade de reduzir a pressão física e química resultante do processo de refrigeração, congelação e descongelação dos espermatozoides, podendo ser divididos

em duas classes: crioprotetores penetrantes e não penetrantes (GAO et al., 1995; TARVIS, 2018) (Figura 6).

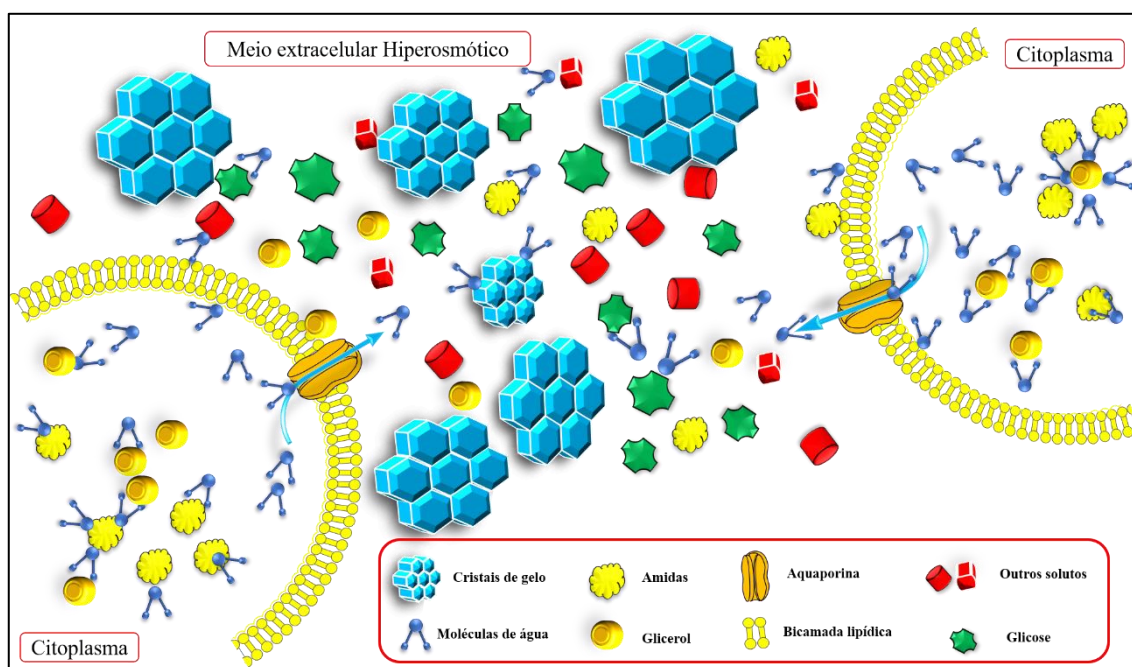


FIGURA 6. Representação esquemática do papel dos crioprotetores intracelulares durante a criopreservação do sêmen equino. Os protetores encontram-se tanto no meio intra quanto extracelular, durante a curva negativa abaixo de -5°C os cristais de gelo começam a serem formados. Deixando o meio extracelular hiperosmótico pela concentração de solutos não congelados, as moléculas de água tendem a se deslocarem para o meio hiperosmótico, passando através das aquaporinas. 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. (Adaptado de BOLT, 2013)

2.5.1. Crioprotetores não penetrantes

Os crioprotetores não penetrantes são substâncias com grandes moléculas tais como os açúcares (frutose, lactose, sacarose, rafinose, trealose), proteínas, lipoproteínas da gema do ovo e leite desnatado (GRAHAM, 1996). Esses crioprotetores protegem as células externamente e não tem a capacidade de passar pela membrana plasmática.

Os açúcares desidratam espermatozoides, reduzindo assim a probabilidade de que grandes cristais de gelo se formem dentro das células. Por outro lado, a gema de ovo

proporciona uma proteção aos espermatozoides, sendo capaz de prevenir danos a estas células (FOULKES, 1977). As proteínas presentes do leite exercem um papel similar na criopreservação semelhante ao exercido pela gema de ovo. Neste sentido, os meios diluentes à base de leite têm sido atribuídos à sua composição proteica que atua principalmente como tampão, havendo relato de sua proteção parcial contra a redução da temperatura durante o processo de refrigeração (SALAMON; MAXWELL, 2000).

2.5.2. Crioprotetores penetrantes

Os agentes penetrantes são micromoléculas, que penetram na membrana plasmática do espermatozoide, possuem alta solubilidade em água. Assim, diminuir o ponto de congelação médio da água através da ligação com moléculas de água e aumenta o volume da fração não congelada e ajudar na formação de tendências de soluções de cristais amorfos, pela diminuição na nucleação de gelo, diminuindo a probabilidade de formação de grandes cristais de gelo intracelular (AMANN; PICKETT, 1987; YAVIN; ARAV, 2007; BENSON et al., 2012; TARVIS, 2013; PRIEN; IACOVIDES, 2016; ZHAO; JIANPING, 2017). Agem através de diferentes mecanismos: causam transporte de água nos espermatozoides dependendo da osmolaridade do meio, direcionando o fluxo da água; formam ligações de hidrogênio com moléculas de água, baixam o ponto de congelação da solução e evitam a cristalização do gelo; interagem com as modificações da membrana que ocorrem durante o processo de criopreservação; impedem a exposição dos espermatozoides a altas concentrações de eletrólitos intra e extracelulares (porque eles se ligam e parcialmente substituem a água) (IAFFALDANO et al., 2014).

Os crioprotetores penetrantes também causam o rearranjo lipídico e proteico da membrana, o que resulta em aumento da fluidez da membrana, maior desidratação a temperaturas mais baixas e, portanto, maior capacidade de sobreviver à criopreservação (HOLT, 2000). Além de serem solventes, participando na dissolução de açúcares e sais no meio de criopreservação (PURDY, 2006; IAFFALDANO et al., 2014).

Os crioprotetores são classificados em dois grupos: álcoois que são etilenoglicol, glicerol e as amidas: metilformamida, dimetilformamida, dimetilacetamida. Um crioprotetor ideal deve possuir algumas características importantes como baixo peso molecular, excelente solubilidade em água e uma mínima toxicidade as células (ASHWOOD-SMITH, 1987).

2.5.2.1. Glicerol

O GLY é o crioprotetor mais frequentemente utilizado na criopreservação do sêmen em diferentes espécies, inclusive é o mais usado universalmente para criopreservação de espermatozoides de garanhões (SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005; MOORE et al., 2005; STZEIN et al., 2018).

GLY é um álcool com grupamento hidroxila, possui três carbonos e três grupos funcionais de hidroxila que contém oxigênio, podendo se ligar ao hidrogênio da molécula da água em seis sítios diferentes. No entanto grupamentos formado por álcoois podem se ligar em si e diminuir as chances de se ligarem a moléculas de água (WOWK et al., 1999). Esse possui um ponto de congelação a -18°C que possibilita aumentar o ponto de congelação as células durante a criopreservação.

A utilização do glicerol como um crioprotetor para o sêmen de garanhão foi descrito primeiro em 1950, por Smith e Polge. Os pesquisadores demonstraram ser um crioprotetor efetivo para a diminuição de água intracelular durante a criopreservação (ROYERE et al., 1996). Apesar do glicerol permitir a criopreservação do sêmen em inúmeras espécies, mesmo assim, pode não ser um crioprotetor ideal para a espécie equina (PRIEN; IACOVIDES, 2016).

Alguns autores relataram haver um efeito tóxico do glicerol (ALVARENGA et al., 2005; HOFFMANN et al., 2011) tal fato pode estar relacionado à lentidão que este crioprotetor penetra na membrana plasmática e isso pode induzir o estresse osmótico, justificando a sua toxicidade às células (PRIEN; IACOVIDES, 2016). Em dias atuais as bases de crioprotetores incluem combinações como o glicerol e amidas (PRIEN; IACOVIDES, 2016). Tais combinações sugerem que essa associação possui baixo peso molecular, promovendo o aumento da solubilidade da água e uma mínima toxicidade (ALVARENGA et al., 2005), provando ser vantajoso para a preservação da membrana plasmática em sêmen de garanhões (PRIEN; IACOVIDES, 2016).

Hay et al. (1997), relataram que a adição com glicerol a diluentes de congelação do sêmen em cães, levou ao declínio da ligação dos espermatozoides aos oócitos. Esse acontecimento pode ser justificado pela ação do glicerol a proteínas que estão na superfície da membrana dos espermatozoides e participam da ligação com o oócito durante o processo de fertilização, dessa forma, as proteínas devem ter perdido a sua função (GRAHAM, 1996).

No entanto, Graham (2000) comparou diferentes crioprotetores no ejaculado de garanhões, sendo congelado com glicerol, acetamida, metilacetamida, formamida, metilformamida ou dimetilformamida. Os resultados de motilidade espermática após descongelação foram 60%, 8%, 20%, 5%, 40% e 37%, respectivamente. Neste estudo, o glicerol apresentou melhores taxas de motilidade espermática.

Fayrer-Hosken et al. (2008) utilizaram o diluente INRA 96 acrescido de 3 e 6% de GLY e não encontraram diferença estatística na média da motilidade pós-descongelação entre as duas concentrações, no entanto em alguns indivíduos o INRA 96 com 6% de glicerol mostrou viabilidade pós-descongelação superior ao mesmo ejaculado congelado com INRA 96 com 3%. Os mesmos autores realizaram teste de fertilidade com sêmen congelado com INRA 96, acrescido de 6% de glicerol em dois diferentes garanhões A e B e conseguiram uma taxa de fertilidade 60 e 50% respectivamente. Dessa forma, concluíram que esse grupo de animais estudado possuíam uma tolerância ao efeito tóxico do glicerol. Oldenhof et al. (2017), demonstraram que o GLY foi efetivo na criopreservação do sêmen equino, entretanto esse deve ser usado em menores concentrações para evitar danos osmóticos aos espermatozoides dos equinos.

Apesar do seu uso na crioprervação de sêmen com o GLY, esse ainda produz dano osmótico por causa de sua baixa permeabilidade na membrana plasmática celular (BALL; VO, 2001) que é muito menor do que a água e outros crioprotetores tais como MF, DMF e DMA (GLAZAR et al., 2009).

Pesquisas demonstraram que DMF são muito mais permeáveis que o GLY (AMANN, 1998; GLAZAR et al., 2009) nos espermatozoides dos garanhões, induzindo menor estresse osmótico em comparação ao GLY (RODRIGUEZ et al., 2012). E, se efetivamente o estresse osmótico é a principal fonte de dano para os espermatozoides de garanhões, usando diluentes que contenham o GLY possivelmente poderá provocar lesões das células durante a congelação (PENÃ et al., 2011).

Mais justificativas em relação à permeabilidade do glicerol, têm-se que quando a adição de concentrações crescentes de um soluto permeável, GLY (600-1800mOsm/Kg H₂O), teve como resultado queda na motilidade e viabilidade dos espermatozoides; todavia, a redução na motilidade não foi tão grande quanto a observada quando a osmolaridade foi aumentada pela adição de não solutos permeável (BALL; VO, 2001). Esta observação reflete a capacidade de GLY em atingir o equilíbrio através da membrana plasmática (BALL; VO, 2001).

De forma mais simplificada, após a exposição a concentrações crescentes de um soluto permeável, contendo GLY, os espermatozoides encolhem devido a uma perda de água e em seguida, incham quando a água e o soluto permeável entram na célula (BALL; VO, 2001). Quando os espermatozoides carregados com GLY são colocados em um meio isosmótico, inicialmente as células incham à medida que a água entra na célula e depois encolhem, com o movimento do soluto e a água para fora da célula (BALL; VO, 2001).

Na tentativa de diminuir os danos osmóticos causados pelo GLY, alternativamente, crioprotetores de baixo peso molecular podem ser menos prejudiciais aos espermatozoides equino (GLAZAR et al., 2009). Desta forma, observa-se que a utilização amidas como protetor, resulta em maiores porcentagens espermatozoides equino viáveis após o congelamento ao compara-se com os espermatozoides criopreservados usando o glicerol como crioprotetor (MEDEIROS et al., 2002).

2.5.2.2. Amidas

As amidas são crioprotetores utilizados em muitas espécies ao longo dos anos, a sua estrutura química é formada por dois grupos funcionais uma amina e um ácido carboxílico, podem aceitar hidrogênio da água em três sítios de ligação, ou seja, essas possuem metade das possíveis ligações em moléculas de água em comparação com o glicerol, por outro lado possuem um ponto de fusão mais baixo que o glicerol $\sim -28^{\circ}\text{C}$ (NASH, 1966).

Na tentativa de minimizar o dano osmótico, têm-se utilizado as amidas tais como dimetilformamida, dimetilacetamida e metilformamida, as quais possuem pesos moleculares mais baixos e maior permeabilidade à membrana quando comparadas ao glicerol e, portanto, têm sido usadas como crioprotetores alternativos para o sêmen criopreservado de garanhão (ASHWOOD-SMITH, 1987; SALAMON; MAXWELL, 2000; ALVARENGA et al., 2005; BARANAAMNUAY et al., 2011).

As amidas têm mostrado benefícios na criopreservação de sêmen de garanhões, diminuindo os resultados prejudiciais do GLY (PEÑA et al., 2011), principalmente em garanhões sensíveis a congelamento (MEDEIROS et al., 2002; PEÑA et al., 2011; PRIEN; IACOVIDES, 2016). A dimetilformamida mostrou melhorias na motilidade e integridade de membrana espermática (HOFFMANN et al., 2011; OLDENHOF et al., 2017).

Em experimento voltado para investigar o efeito crioprotetor de três diferentes amidas: DMA, DMF e MF Medeiros (2003), verificou que a DMF e MF, melhoraram

significativamente a maioria das variáveis avaliadas, quando comparadas com GLY e DMA. As motilidades totais foram maiores, em diluentes contendo DMF e MF foi superior para a maioria dos ganhões.

Gibb et al. (2013), avaliaram o efeito do GLY e DMF 4% em ejaculados de gansão em diferentes tempos de refrigeração e encontraram uma maior motilidade total quando os espermatozoides foram criopreservados com DMF (33%) em comparação aos criopreservado com GLY (27%).

2.6. Princípios da criopreservação

Os acontecimentos físicos da água se baseiam no princípio da formação de cristais de gelo, dessa forma, a solidificação desta substância se dá a 0°C, a medida que se modifica, acrescenta ou concentra partículas, modificará também o ponto de congelação. Durante esse processo as partículas da água se transformam em pequenas partículas de cristais agregadas. Nos espermatozoides, a lesão celular causada durante a congelação e descongelação acontece devido à formação de grandes cristais de gelo intracelular, que modificam a arquitetura celular (PICKETT, 1986).

A primeira fase crítica que as células espermáticas passam é durante a refrigeração na qual os espermatozoides equinos saem de uma temperatura ambiente até 5°C. Nesta fase, a membrana celular passa por modificações em sua estrutura, passando do estado líquido cristalino, para forma semelhante a gel, denominada de fase de transição da membrana (AMANN; PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996; SQUIRES et al., 1999).

Em temperatura corporal, o metabolismo do espermatozoide está no máximo potencial, assim como, em temperatura ambiente não será muito diferente (SQUIRES et al., 1999). Nessas condições, o metabolismo das células espermáticas produz ácido lático e/ou CO₂, sendo que o resíduo desses produtos pode aumentar a acidez do sêmen, causando dano celular permanente, peroxidação lipídica de membrana, resultando em dano na membrana e em geral, desgaste das células (GRAHAM, 1996; SQUIRES et al., 1999).

O que se sabe é que a cada 10°C de redução da temperatura das células, o metabolismo celular reduz em 50% em relação à temperatura na qual estava anteriormente (AMANN; PICKETT, 1987; SQUIRES et al., 1999). Desta forma, espermatozoides acondicionados a 5°C, possuem apenas 10% do metabolismo com relação a temperatura que estavam anteriormente. Consequentemente, estas células

armazenadas em temperatura de 5°C não produzirão resíduos em excesso gerados através do metabolismo, permanecendo sem grandes desgastes metabólicos. Todos esses fatores associados aos diluentes usados durante o armazenamento do sêmen, tendem a oferecer longevidade maior às células espermáticas refrigeradas, em comparação com aquelas armazenadas em temperatura ambiente (AMANN; PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996; SQUIRES et al., 1999).

Cronologicamente, a criopreservação das células espermáticas é dividida em etapas: a primeira logo após a colheita e avaliação, os espermatozoides são diluídos em meios específicos que os ajudarão manter a viabilidade; em seguida, essas células são submetidas à centrifugação para retirada do plasma seminal em equinos; por conseguinte, acrescido diluente contendo concentrações variadas de crioprotetores, esses possuem a função de proteger as células durante o período que serão submetidas a refrigeração; e posterior congelamento (HAMMERSTEDT et al., 1990).

Durante a passagem pela fase de transição, ocorre alterações na conformação dos lipídios de membrana que pode induzir a bicamada de fosfolipídios a formar novos arranjos das moléculas, um desses arranjos é denominado fase hexagonal-II. Durante essa fase alguns os lipídios não integrantes da bicamada fosfolipídica voltam suas cabeças do agrupamento polar para o centro e as caudas hidrocarbonadas ficam para o exterior, essa estrutura provoca pontos de fragilidade na membrana plasmática, fragiliza a barreira de permeabilidade e pode levar a ruptura da membrana (AMANN; GRAHAM, 1993). As implicações de danos ocorridos nessa fase será a redução da quantidade de células íntegras ou perda de importantes componentes celulares, formação de vesículas que irão prejudicar as células durante a fusão com o oócito (HAMMERSTEDT et al., 1990). Além disso, outros eventos que podem ocorrer, associados a fase hexagonal-II é a mudança da interação proteína-lipídio, remoção dos lipídios que antes eram ligados a proteínas e baixa mobilidade lateral das proteínas dentro da membrana (AMANN; GRAHAM, 1993; PICKETT; KOMAREK, 1967) (Figura 6).

Outro acontecimento que pode ocorrer durante a refrigeração é a desnaturação e perda da função das proteínas integrantes e periféricas que situam-se na membrana dos espermatozoides (HAMMERSTEDT; HAY, 1980). Sendo assim, as proteínas que antes estavam envolvidas no transporte de substâncias do meio intra e extracelular, como proteínas da bomba de sódio e potássio perdem a sua função acarretando no inadequado funcionamento celular. A perda da função dessas enzimas, gera uma cascata de eventos, tais como: déficit do transporte de substâncias, como H^+ por exemplo, que culmina com

um acúmulo intracelular desse íons, formação de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular; levar a alteração do pH das células, alterar carga elétrica, alterar o potencial hidrogeniônico ácido (PKa) e promover injúrias ao DNA da célula (HAMMERSTEDT; HAY, 1980; PICKETT, 1986) (Figura 7).

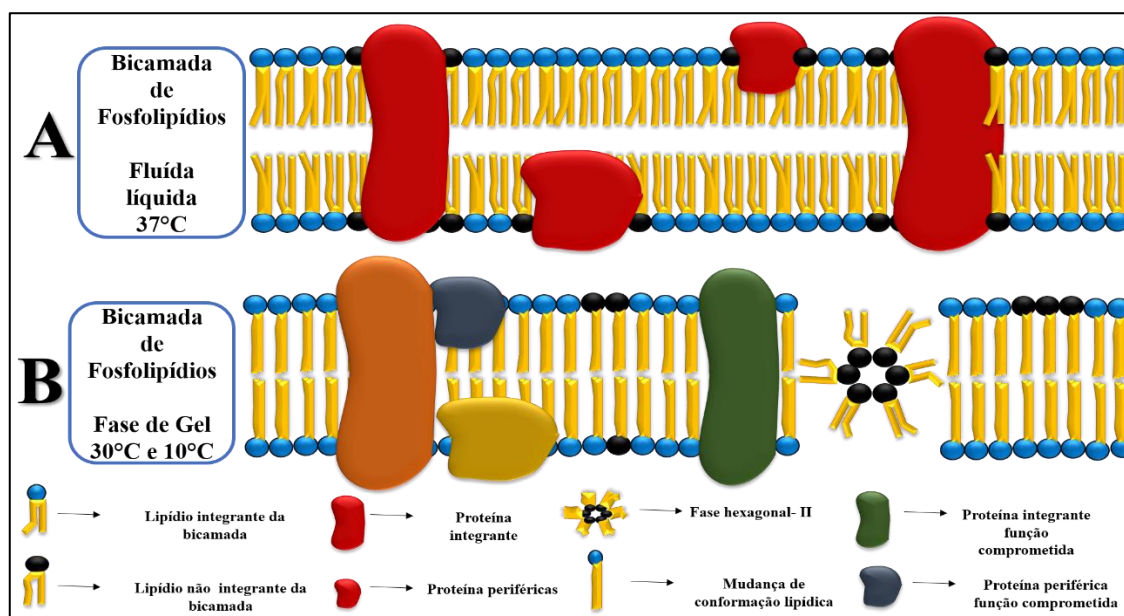


FIGURA 7. Fases da bicamada fosfolipídica da membrana plasmática do espermatozoide, duas fases distintas de acordo com a temperatura que se encontram: **A** - Fase fluída a temperatura de 37°C, **B** - Mudança para a fase de gel temperatura entre 30°C e 10°C. (Arquivo Pessoal)

Desta forma, se durante a passagem da fase líquida para a fase de gel, as células forem refrigeradas inadequadamente, essas passam por um processo chamado choque frio, que causa danos celulares irreversíveis (PICKETT; KOMAREK, 1967). A principal característica pós-choque térmico é a mudança no padrão de motilidade. Assim, as principais mudanças observadas na motilidade são: movimento circular fechado, queda da motilidade total e progressiva, redução da atividade metabólica, danos na membrana plasmática e acrossomal e perdas dos componentes intracelulares (AMANN; GRAHAM, 1993). Essas consequências, podem ser minimizadas quando a refrigeração é realizada através do controle da taxa de refrigeração, durante a temperatura considerada crítica para a espécie, entre 30°C e 10°C (OLDENHOF et al., 2012; OLDENHOF et al., 2015; WOLKERS et al., 2019), assim como, a adição de lipídios ou lipoproteínas disponibilizadas em meios diluentes (GRAHAM, 1996).

A osmose é um acontecimento físico que ocorre durante o processo de criopreservação, tem como característica a movimentação de água de um ambiente de baixa concentração de soluto (hiposmótico) para um ambiente de alta concentração de soluto (hiperosmótico) (MAZUR, 2004; OLDENHOF et al., 2015). Os crioprotetores não penetrantes e penetrantes, criam um ambiente hiperosmótico extracelular o que torna as células hiposmóticas em relação ao meio que estão (TARVIS, 2013). Dessa forma, há troca de água do meio interno e externo das células até essas se tornarem isosmótica em relação ao meio em que estão. Esse transporte de água do meio intracelular para o meio extracelular ocorre de forma passiva ou ativa envolvendo as proteínas dos canais iônicos (KAYSER et al., 1992).

Como resultado, as células ficam expostas a condições hiperosmótica e diminuem o volume, enquanto as células expostas a condições hiposmótica aumentam em volume, graças ao transporte da água para fora ou para dentro da célula, respectivamente, esse processo de expandir e encolher as células, pode acarretar em alterações na regulação da homeostase, induzir ao edema espermático e consequentemente ser letal os espermatozoides (MAZUR, 2004; OLDENHOF et al., 2015).

A água intracelular sairá da célula espermática fazendo com que a célula diminua de diâmetro temporariamente (HAMMERSTEDT et al., 1990). Essas trocas ocorrem até o limite de tolerância das células entre 350 a 850mOsm/Kg H₂O (BALL; VO, 2001; OLDENHOF et al., 2015). Sendo assim, quando as células encolhem além do limite de tolerância osmótica, pode ocorrer danos irreversíveis a membrana celular e comprometer a sua sobrevivência, denominados de choque ou estresse osmótico (OLDENHOF et al., 2015). É importante que se tenha tempo suficiente para que haja um adequado equilíbrio entre o meio interno e externo das células (TARVIS, 2013). Embora a resposta sobre a tolerância osmótica na espécie equina não seja bem definida (BALL; VO, 2001), a bomba de sódio e potássio, parece desempenhar um papel importante na manutenção da normalidade intracelular da osmolaridade das células espermáticas e a inibição desta bomba reduz a tolerância destas células a mudanças na pressão osmótica (CAIZA DE LA CUEVA et al, 1997). Além disso, há evidências de que os espermatozoides possuem canais seletivos de água que facilitam o movimento de água através de suas membrana (BALL; VO, 2001). Os crioprotetores penetrantes não atravessam a membrana tão rapidamente como a água, portanto deve-se levar em consideração o tempo que deve ser suficiente para que haja equilíbrio, assim como, a osmolaridade do meio é de suma importância (AMANN; PICKETT, 1987).

O ponto de congelação de uma solução, depende da concentração de partículas que contém e/ou da concentração de moléculas que a solução possui. Por exemplo, a água congela a 0°C, por outro lado, o citoplasma das células possui diferente composição e por isso congela abaixo de -1°C, diluentes de congelação têm seu ponto de congelação em temperaturas mais baixas, devido a presença dos crioprotetores (AMANN; PICKETT, 1987).

Durante o processo de congelação no momento que as células encontram-se a uma temperatura de -5°C, tanto o meio extracelular que contém o meio diluente de congelação com crioprotetores quanto o citoplasma das células ainda não estão congeladas. Durante o decrescimento de temperatura entre -10°C e -15°C, é o segundo ponto crítico da congelação é quando começa a formação dos cristais de gelo no meio extracelular, neste momento, o meio intracelular das células ainda encontram-se não congelados e sim em uma temperatura considerada super-refrigerado, possivelmente devido ao bloqueio causado pela membrana plasmática impedindo a formação de cristais de gelo dentro do citoplasma (MAZUR; COLE, 1989; GÃO; CRITSER, 2000; SQUIRES et al., 1999) (Figura 8).

A medida que os gametas masculinos passam pela curva negativa de congelação, acontecem alguns eventos simultaneamente, anterior a esta fase as células encontrava-se em ambiente isosmótico em relação ao meio. A redução da temperatura tem como consequências o aumento de solutos extracelular não congelados, essa concentração de solutos torna o meio extracelular hiperosmótico e essa diferença de concentração faz com que a água super resfriada do meio intracelular através da pressão de vapor saia para o meio extracelular (Figura 8). Assim, seguindo a lei de Boyle a pressão de vapor da água super-resfriada é maior que a pressão do gelo, desta forma, causa a saída da água do meio intracelular para o extracelular, aumentando assim a pressão osmótica. O evento que acontece nesse momento é a desidratação das células, de maneira que a temperatura cai as células e o meio extracelular chegam a um ponto que ambos estão congelados, essa congelação eliminaria o diferencial de pressão de vapor entre o meio inter e extra celular, estando todos os líquidos congelados chamado ponto eutético de temperatura (-80°C) (MAZUR, 1963; ZÚCCARI, 1998; SQUIRES, 1999; MEDEIROS, 2003; OLDENHOF et al., 2017).

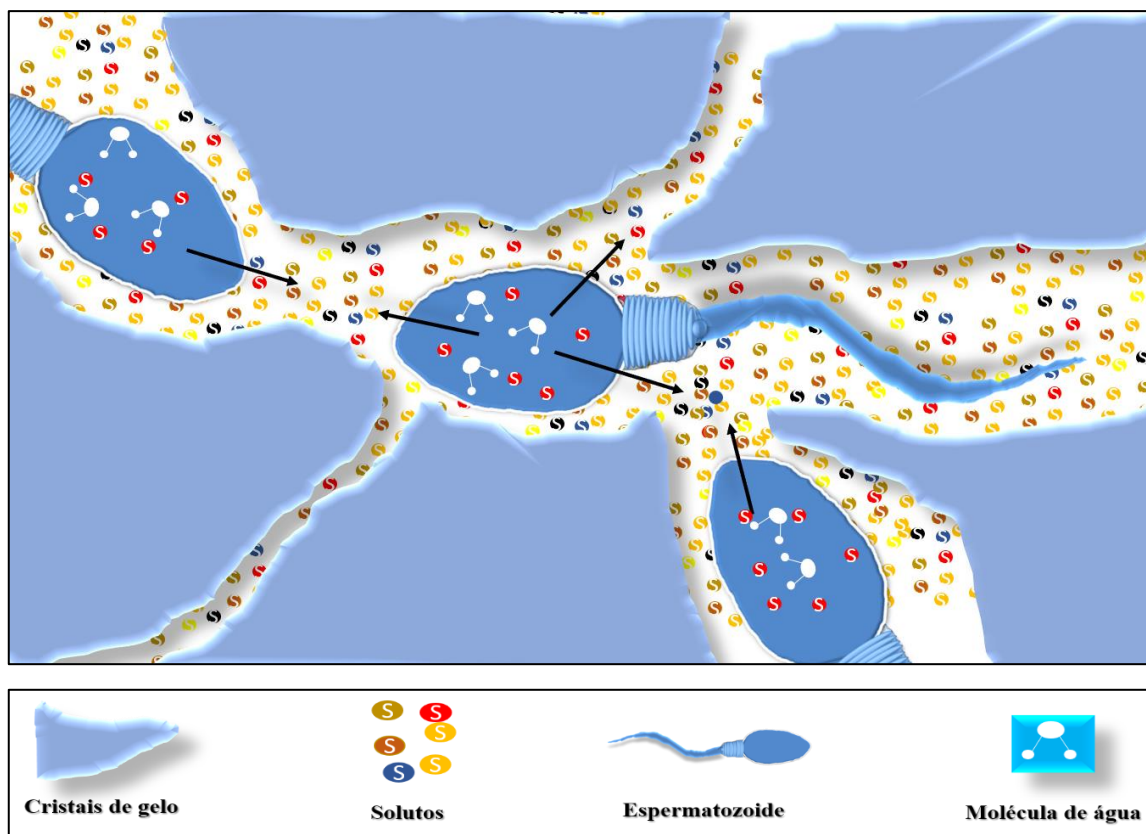


FIGURA 8. Momento do início da formação dos cristais de gelo extracelular (-10°C e -15°C), nesse momento há concentração de soluto no meio extracelular, células estão super-resfriadas, ocorre a redução do volume das células espermáticas pela migração da água do citoplasma para o meio extracelular. (Adaptado de SQUIRES et al., 1999)

Neste momento, o volume celular deve ser suficientemente grande para suportar a função intracelular e pequeno o suficiente para manter a bicamada de fosfolípidios da membrana plasmática (AMANN; GRAHAM, 1993). Quando os espermatozoides atingem uma temperatura de -80°C , a fração não congelada dos espermatozoides vitrificam e tornam-se inertes. A partir desse momento, não há trocas entre os meios intra e extracelular, assim, possivelmente as células espermáticas poderiam ser imersas e mantidas armazenadas a -196°C indefinidamente (GRAHAM, 1996).

Para haver uma congelação equilibrada lenta ou mais precisa, existem duas prováveis hipóteses para o sucesso na criopresevação: o primeiro seria a interação entre a taxa de resfriamento e formação do gelo intracelular (MAZUR, 1963). Sendo assim, a concentração do meio extracelular aumenta conforme a temperatura diminui, se a taxa de resfriamento for lenta, o desequilíbrio causado pela concentração extracelular pode ser corrigido pelo influxo de crioprotetores penetrantes nas células. Desta forma, tem-se

como resultado a diminuição do volume de líquidos na célula e aumento da osmolaridade intracelular (BENSON et al., 2012).

Em tese, tem-se que o aumento da osmolaridade intracelular, possa ser contínuo até que o espermatozoide desidrate o suficiente para ser imerso no nitrogênio líquido, quando o seu citoplasma irá se transformar em cristais de gelo (BENSON et al., 2012). Uma exposição prolongada com altas concentrações de sais pode causar danos irreversíveis às células por conta da diferença de osmolaridade. Na taxa de refrigeração lenta ($<-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$), toda a água disponível pode ser removida do meio intracelular, assim, há uma desidratação excessiva, embora isso seja ideal para prevenir a formação de cristais de gelo intracelular, pode haver demasiada concentração de solutos intracelular (SEIDEL, 1986) (Figura 9).

Entretanto, uma taxa de refrigeração ótima (-20°C e $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$) permite tempo suficiente para as células formarem pequenos cristais de gelo para prevenir a concentração de solutos da fração não congelada dentro do citoplasma, assim manter o potencial químico da água entre os ambientes intra e extracelular (MAZUR et al., 1972; BENSON et al., 2012). Se por outro lado, espermatozoides submetidos a taxas rápidas ($>-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$), a água intracelular não tem tempo suficiente para difundir do meio intra para o extracelular, antes de chegar ao ponto eutético, dessa forma, o resultado seria a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (PICKETT, 1986; ZÚCCARI, 1998; SQUIRES et al., 1999). Sendo assim, as taxas de refrigeração durante o processo de congelamento devem ser levadas em consideração sendo um importante aliado no sucesso da criopreservação das células espermáticas (Figura 9).

Da mesma forma, as taxas de descongelamento devem ser levadas em consideração, essa pode ser feita de forma mais lenta ou mais rápida, isso depender da taxa de refrigeração em que os espermatozoides foram congelados. Espermatozoides congelados com taxa lentas devem ser descongelados também com taxas lentas. O aquecimento ajuda a descongelar lentamente a água e, conseqüentemente há retorno dessa para o meio intracelular para diluir a fração de solutos intracelular e voltar a concentração inicial (MAZUR, 1985; PICKETT, 1986; SQUIRES et al., 1999). Do contrário, se a descongelamento for feita de forma rápida, há um rápido retorno de água para dentro do citoplasma celular e que pode provoca ruptura da membrana plasmática pela força osmótica de retorno da água (MAZUR, 1985) (Figura 10).

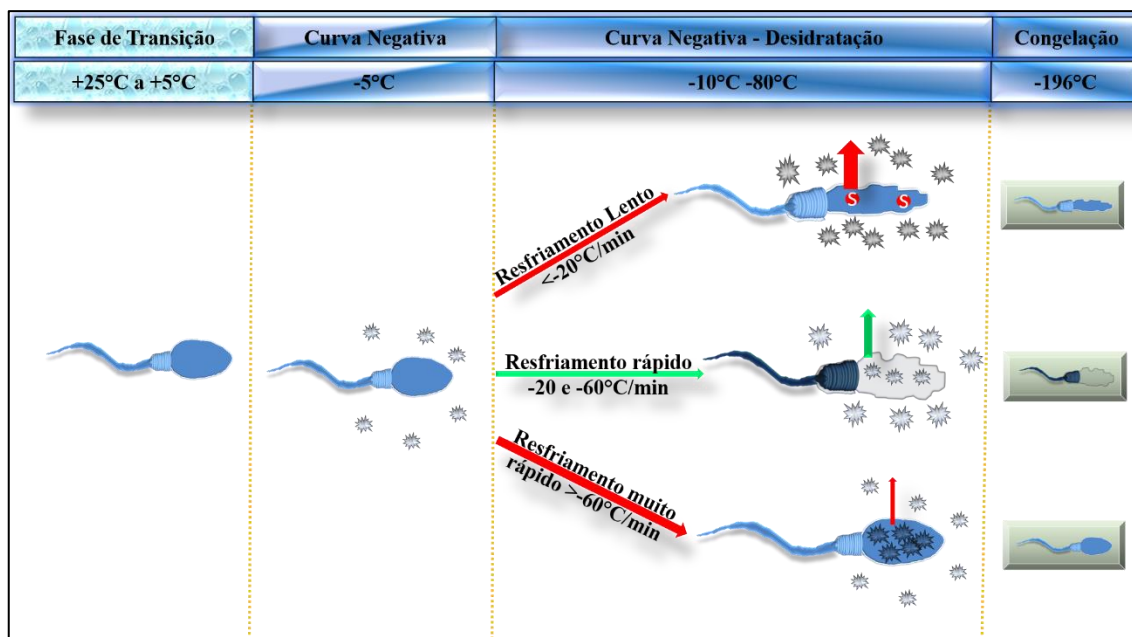


FIGURA 9. Representação esquemática dos prováveis acontecimentos físicos durante a criopreservação do sêmen equino. As estrelas representam formação de cristal de gelo intra e extracelular durante a curva negativa (-5°C). Durante a refrigeração a água sai das células induzida pela formação dos cristais 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. (Adaptado de MAZUR, 1985)

Quando as células forem criopreservadas com taxa moderadas de refrigeração, devem ser descongelado com moderadas, neste caso, existe a descongelação dos cristais de gelo extracelular ocorre de maneira moderada e a água volta para dentro da célula de forma mais lenta, diminuindo os possíveis danos celulares (MAZUR, 1963; MAZUR, 1985; PICKETT, 1986; SQUIRES et al., 1999; OLDENHOF et al., 2017) (Figura 10).

Espermatozoides congelados com taxas rápidas de congelação devem ser descongelados com taxa rápidas de descongelação, desta forma, a descongelação rápida extracelular dos solutos, previne danos as células, as células não se encontram desidratadas, elas estão em equilíbrio entre o meio interno e externo. Se caso a descongelação ocorrer de forma lenta, os grandes cristais de água podem descongelar e recrystalizar em pequenos cristais de gelo levando a danos osmóticos (MAZUR, 1963; MAZUR, 1985; PICKETT, 1986; SQUIRES et al., 1999) (Figura 10).

Estudos sugerem que os maiores danos que ocorrem durante a criopreservação de sêmen em garanhões, são devidos ao desequilíbrio osmótico (MORRIS et al., 2007),

assim como, a formação de grandes cristais de gelo intracelular durante a congelação e descongelação (MAZUR et al., 1972). Dessa forma, a desestabilização da membrana plasmática, provoca lesões osmóticas e oxidativas (GLAZAR et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2012).

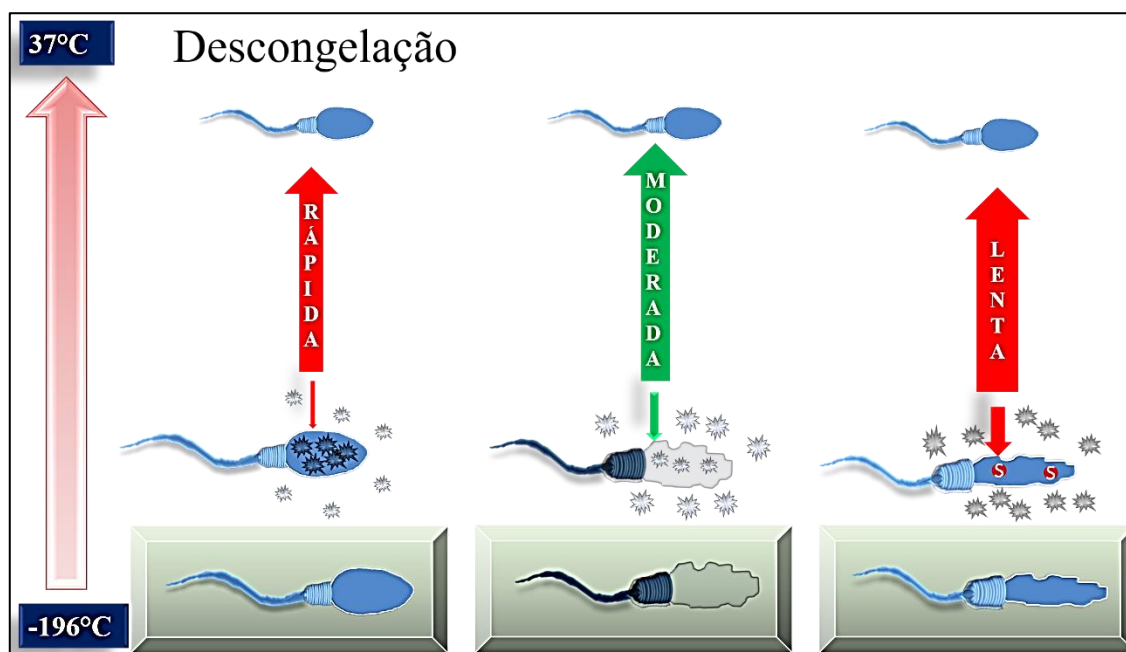


FIGURA 10. Representação esquemática dos prováveis acontecimentos físicos durante a descongelação do sêmen equino. A taxa de descongelação deve ser proporcional a taxa de descongelação: sêmen congelado em curva rápida a descongelação deve ser rápida; sêmen congelado em curva moderada a descongelação deve ser moderada; sêmen congelado em curva lenta a descongelação deve ser lenta. As setas indicam a entrada de água para dentro dos espermatozoides. (Adaptado de MAZUR, 1985)

2.7. Diferentes curvas de congelação entre crioprotetores

A adição de crioprotetores às células antes do resfriamento tem como função controlar o volume células e pode controlar as lesões osmóticas causadas quando o volume é alterado por ultrapassagem do limite superior e inferior (BENSON et al., 2012).

A criopreservação é a manutenção bem-sucedida a longo prazo da função biológica celular ou tecidual a baixas temperaturas, suprimindo o metabolismo e as reações bioquímicas, cessando efetivamente o tempo biológico (MULLEN; CRITSER, 2007) (ZHAO; JIANPING, 2017). A maioria das células de mamíferos é congelada a 1°C/min (ZHANG et al., 2011). Para minimizar o efeito das lesões pela formação de gelo

intracelular, causada pelo efeito de solução, taxa de refrigeração ideal proporciona maior sobrevivência celular (LEIBO et al., 1970; MAZUR, 1984; ZHAO; JIANPING, 2017).

Durante a criopreservação em uma curva lenta de congelação, as células podem sofrer lesões causadas pelo transporte de soluções do meio intra para o extracelular devido a formação de gelo extracelular (MAZUR, 1970; MAZUR, 1984).

Na literatura é fácil encontrar uma enorme variação em relação as curvas positivas de refrigeração. Sabe-se que para cada um dos diluentes de congelação mundialmente comercializados, existe uma recomendação do fabricante, quanto a curva de refrigeração utilizar, devido a composição de crioprotetores não penetrantes e penetrantes ou a associação de ambos (OLDENHOF et al., 2013). As curvas positivas variam de $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ a $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, essa variação também propicia uma gama de diferentes resultados de viabilidade espermática (DELL'AQUA Jr. et al., 2001; PAPA et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002; SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005; VIDAMENT, 2005; PAPA et al., 2008; LOOMIS; GRAHAM, 2008; SALAZAR Jr. et al., 2011; HOFFMANN et al., 2011; OLDENHOF et al., 2012; GIBB et al., 2013; OLDENHOF et al., 2013; PUKAZHENTHI et al., 2014; OLDENHOF et al., 2017; MORAES; MEYERS, 2018; MAZIERO et al., 2019).

Durante a mudança da fase líquida para fase de gel a curva de refrigeração pode beneficiar a fase de transição dos lipídios, possivelmente poderá ser mais benéfico quando a temperatura cai de forma controlada e gradativa (OLDENHOF et al., 2017), sendo assim, pode diminuir os riscos de danos osmóticos durante a fase crítica da refrigeração entre 30°C e 10°C (OLDENHOF et al., 2012; OLDENHOF et al., 2015; WOLKERS et al., 2019).

O mesmo tempo de refrigeração utilizada rotineiramente para o glicerol foi também utilizada inicialmente para as amidas. Em tese, um tempo de refrigeração a 5°C mais rápido poderia ser desejável para as congelações utilizando as amidas, devido à diferença entre o peso molecular desta substância quando comparado ao glicerol. Enquanto o glicerol possui peso molecular na sua fórmula de $92\text{g}/\text{mol}$ a metilformamida $59\text{g}/\text{mol}$ e a dimetilformamida $73\text{g}/\text{mol}$ (ALVARENGA et al., 2005).

Além disso, no processo de congelação e descongelação as células ainda passam por duas situações distintas, a saída de líquido intracelular durante a congelação e o retorno do líquido durante a descongelação na presença de um crioprotetor (BARANAAMNUAY et al., 2011). Gao et al. (1995) relatam que a toxicidade osmótica ocorre quando o crioprotetor penetra na membrana celular de forma mais lento que a

água, resultando em um aumento do volume de líquido intracelular além da sua capacidade de suporte durante a adição e remoção dos crioprotetores.

Moffet et al. (2003), compararam dois extensores básicos para congelar espermatozoides de garanhões e não encontraram diferença em motilidade pós-descongelação quando o sêmen de garanhão foi congelado utilizando o dimetilformamida em lactose-EDTA Gema de ovo sem refrigeração antes da congelação ou com leite desnatado e gema de ovo com refrigeração por 2h a 5°C.

Alvarenga et al. (2005) compararam taxas de congelação diferentes com dimetilformamida e metilformamida ambos com uma concentração de 5% (v/v) utilizando o diluente à base de gema de ovo e leite (INRA 82). As palhetas foram refrigeradas durante 60 minutos desde a temperatura ambiente até 5°C e depois congeladas a uma curva lenta de -20°C/min ou rápida -70°C/min. Esses autores encontraram pós-descongelação 57% e 17%, 54% e 22% de motilidade total e progressiva respectivamente para amostras congeladas na curva lenta de -20°C/min ou rápida -70°C/min, não sendo observado diferença entre as curvas a cinética espermática.

Gibb et al. (2013), avaliaram diferentes tempos de refrigeração (zero, 30, 60, 90 e 120 minutos) durante a criopreservação de sêmen de garanhões utilizando dois diferentes crioprotetores o glicerol e a dimetilformamida na concentração de 4%, relataram que um tempo de refrigeração de 90 minutos resultou em uma maior motilidade total (33%) em comparação a metodologia sem refrigeração tempo zero minuto (28%) ou 120 minutos (29%).

É importante ter como parâmetro que os crioprotetores, assim como, as curvas de refrigeração ajudam as células durante a passagem crítica de -15°C a -60°C, para que as células ultrapassem essa temperatura de forma bem sucedida (GAO; CRISTER, 2000; MAZUR, 1984).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso da criopreservação do sêmen equino depende de muitas vertentes, que devem ser analisadas com critério para se obter bons resultados. O entendimento minucioso de cada processo em que os espermatozoides serão submetidos ajuda a traçar metas e objetivos para identificar possíveis falhas durante a criopreservação. Para a escolha do crioprotetor a ser utilizado deve-se levar em consideração as suas características químicas e os fatores limitantes de cada um. As curvas de refrigeração devem ser bem entendidas e a sua adoção depende de alguns fatores como o meio diluente que será utilizado e o crioprotetor. Uma possibilidade aceitável, seria testar diferentes curvas de refrigeração com o sêmen do mesmo garanhão e definir a melhor opção para cada indivíduo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKCAY, E.; REILAS, T.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. Effect of seminal plasma fractions on sperm survival after cooled storage. **Journal of Veterinary Medicine**, v.53 p.481-485, 2006.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. **The plasma membrane**. In Molecular biology of the cell. 2. Ed. New York: Garland Publishing, 1989, cap. 6, p.275-340.
- ALVARENGA, M.A.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, E.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. Proceedings of the XI **International Congress on Animal Reproduction and AI**, p.73 (Abstract), 2000.
- ALVARENGA, M.A.; LEÃO, K.M.; PAPA, F.O. Improvement of stallion semen post thaw motility with utilization of dimethylformamide as cryoprotector. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.459, 2002.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKinnon AO, Voss JL. **Equine reproduction**. Philadelphia: Saunders. 1993:715-745.
- AMANN, R.P. **Cryopreservation of sperm**, in: KNOBIL, E.; Neill, J.D. (Eds.), Encyclopedia of Reproduction, vol. 1, Academic Press, New York, NY, 1998, p.773-783.
- AMARAL, A.; LOURENCO, B.; MARQUES, M.; RAMALHO-SANTOS, J. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**, v.146, p.163-174, 2013.
- ASHWOOD-SMITH, M.J. 1987. **Mechanisms of cryoprotectant action**. In: Bowler, K., Fuller, B.J. (Eds.), Temperature and Animal Cells. Biologists Ltd., Cambridge, UK, pp. 395-406.
- AVANZI, B.R.; RAMOS, R.S.; ARAUJO, G.H.M.; FIORATTI, E.G.; TRINCA, L.A.; DELL'AQUA JR, J.A.; OÑA, C.M.M.; ZAHN, F.S.; MARTIN, I.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions? **Theriogenology**, v.83, p.1389-93, 2015.

- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential, **Journal Andrology**, v.22, p.1061-1069, 2001.
- BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science**, v.21, p.47, 1957.
- BENSON, J.D.; WOODS, E.J.; WALTERS, E.M.; CRITSER, J.K. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v.78 p.1682-1699, 2012.
- BERTRAM, R.; GRAM P.M.; LUCIANI D.S.; SHERMAN A.A simplified model for mitochondrial ATP production. **Journal of Theoretical Biology**, v.243, p.575-586, 2006.
- BIELANSKI, W.; KACZMARSKI, F. Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. **Journal Reproduction and Fertility**, (Suppl) v.27, p.39-45, 1979.
- BOLT, J. Freezing cells, **The Scientist**. 2013. www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/34223/title/Freezing-Cells/
- BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, p.129-136, 2000.
- BRITO, L.F.C. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. **Clinical Technique in Equine Practice**. v.6, p.249-264, 2007.
- BURANAAMNUAYA, K.; GROSSFELDA, R.; STRUCKMANNA, C.; RATH D. Influence of cryoprotectants glycerol and amides, combined with antioxidants on quality of frozen-thawed boar sperm. **Animal Reproduction Science**, v.127, p.56-61, 2011.
- CABRERA, T.; RAMIRES-NETO, C.; BELAZ, K.R.A.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; ZAMPIERI, D.; TATA, A.; EBERLIN, M.N.; ALVARENGA, M.A.; SOUZA, F.F. Influence of spermatozoal lipidomic profile on the cryoresistance of frozen spermatozoa from stallions. **Theriogenology**, v.108, p. 161-166, 2018.
- CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; PUJOL, M.R.; RIGAU, T. Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. **Theriogenology**, v.48, p.947-968, 1997.
- DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. **Theriogenology**, v.49, p.831-841, 1997.

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. **The plasma membrane**. In Molecular biology of the cell. 2. Ed. New York: Scientific American Book, 1990, cap.136, p.491-530.

DELL'AQUA Jr., J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; ZAHN, F.S. Effect of packing systems and thawing temperature on spermatoc parameters and fertility rate of frozen equine semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n.1, p.458-460, 2001.

FAYRER-HOSKEN, R.; ABREU-BARBOSA, C.; HEUSNER, G.; JONES, L. Cryopreservation of stallion spermatozoa with INRA96 and glycerol. **Journal Equine Veterinary Science**, v.28, p.672-676, 2008.

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

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.49 p.277-284, 1977.

FREITAS, B.W. **Efeito de diferentes crioprotetores e aditivos no diluente sobre a qualidade seminal de garanhões da raça mangalarga marchador**. Doctor Scientiae. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 2015, 102 pp.

GAO, D.Y.; LIU, J.; LIU, C.; MCGANN, L.E.; WATSON, P.F.; KLEINHAUS, F.W. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of GLY. **Human Reproduction**, v.10, p.1022-1109, 1995.

GAO, D.; CRITSER, J.K. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. **ILAR Journal**, v.41(4), p.187-96, 2000.

GARCÍA, B.M.; FERRUSOLA, C.O.; APARICIO, I.M.; MIRO-MORAN, A.; RODRIGUEZ, A.M.; BALANOS, J.M.G.; FERNANDEZ, L.G.; SILVA, C.M.B.; MARTINEZ, H.R; TAPIA, J.A.; PENA, F.J. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effect on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. **Theriogenology**, v.77, p.1280-1289, 2012.

GIBB, Z.; MORRIS, L.H.A.; MAXWELL, W.M.C.; GRUPEN, C.G. Dimethyl formamide improves the post thaw characteristics of sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology** v.79, p.1027-1033, 2013.

GLAZAR, A.I.; MULLEN, S.F.; LIU, J.; BENSON, J.D.; CRITSER, J.K.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Osmotic tolerance limits and membrane permeability

characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, v.59, p.201-206, 2009.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology** v.58, p.277-279, 2002.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v.12 n.1, p.131-147, 1996.

GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, p. 307 (Abstract), 2000.

HAGERHALL, C. Succinate: quinone oxidoreductases: variations on a conserved theme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1320, p.107-141, 1997.

HAMMERSTEDT, R.H.; HAY, S.R. Effect of incubation temperature on motility and cAMP content of bovine sperm. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.199, p.427-37, 1980.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal Andrology**, v.11, p.73-88, 1990.

HANADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.60, p.247-252, 1980.

HAY, M.A.; KING, W.A; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **Journal Reproduction and Fertility**, v.51, p.99-108, 1997.

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

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

IAFFALDANO N.; IORO, M.D.; ROSATO, M.P.; MANCHISI, A. Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. **Animal Reproduction science**, v.151, p. 220-228, 2014).

KARESKOSKI, A.M.; REILAS, T.; SANKARI, S.; ANDERSSON, M.; GUVENC, K.; KATILA, T. Alkaline and Acid Phosphatase, b-Glucuronidase and Electrolyte Levels in

Fractionated Stallion Ejaculates. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.369-374, 2010.

KARESKOSKI, A.M. **Components of fractionated stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity** [Dissertação]. Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki Finland. 2011, 86p.

KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K.; SQUIRES, E.L.; JASKO, D.J.; PICKETT, B.W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601-614, 1992.

KEITH, S.L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. Colorado.1998. 104p. Tese. Colorado State University Fort Collins.

KRAPF, D. Compartmentalization of the plasma membrane. **Current Opinion in Cell Biology** v.53, p.15-21, 2018.

KÚTVÖLGYI, G. **Development of qualification of fresh and frozen stallion semen, investigation of factor affecting sperm quality using a new evaluation method**. Tese, 2012, p205.

LEIBO, S.P.; MAZUR, P.; CHU, E.H.Y. Factors Responsible for Freezing Injury in Hamster Tissue Culture Cells. **Cryobiology**, v.6(6), p.580-582, 1970.

LEIBO, S.P. **The early History of Gamete Cryobiology**. In: Life in the Frozen State. Edited by Barry J. Fuller, Nick Lane, Erica E. Benson. CRC Press 2004. Pages 347-370.

LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry, **Animal Reproduction Science**, v.68, p.191-200, 2001.

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

MANNELLA, C.A. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. **Biochimica et Biophysical Acta Molecular Cell Research**, v.1763, p.542-548, 2006.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male Reproductive Function and Semen**, 1st edn. New York, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1981.

MASSANYL, L. The ultrastructure of stallion spermatozoa. **Animal Breeding**, v.63, 1995.

MAZIERO, R.R.D.; GUAITOLONI, C.R.F.; GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; MARTINS, I.; SILVA, J.P.M.; CRESPILOHO, A.M.; PAPA, F.O. Effect of using two

cryopreservation methods on viability and fertility of frozen stallion sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.72, p.37-40, 2019.

MAZUR, P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. **The Journal of General Physiology** v.47, (2) p.347-369, 1963.

MAZUR, P.; Cryobiology - Freezing of Biological Systems. **Science** v.168(3934), p.939, 1970.

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; CHU, E.H. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. **Experimental Cell Research**. v.71, p.345-355, 1972.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v.247(3), p.125-142, 1984.

MAZUR, P. **Basics concepts in freezing cells**. Proc First International Conference Deep Freezing Boar Semen. P.91, 1985.

MAZUR, P.; COLE, K.W. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. **Cryobiology**, v.26, p.1-29, 1989

MAZUR, P. (2004). **Principles of cryobiology**. In 'Life in the Frozen State'. (Eds B. J. Fuller, N. L. Lane and E. E. Benson.) pp. 3-65. (CRC Press LLC: Boca Raton, FL.)

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58 p.273-277, 2002.

MEDEIROS, A.S.L. 2003. **Cryopreservation of stallion sperm utilizing different amides**. Master Thesis. University of São Paulo State-UNESP, Botucatu, 123 pp.

MEYERS, S.A. Spermatozoal response to osmotic stress, **Animal Reproduction Science**. v.89, p.57-64, 2005.

MOFFET, P.D.; BRUEMMER, J.E.; CARD, C.; SQUIRES, E.L. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. **Proceedings Society for Theriogenology Annual Conference**, p. 42 (Abstract). 2003.

MORAES, C.R.; MEYERS, S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. **Animal Reproduction Science**, v.194, p.71-80, 2018.

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, p.2372-81, 2005.

- MORRIS, G.J.; FASZER, K.; GREEN, J.E.; DRAPER, D.; GROUT, B.W.; FONSECA F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. **Theriogenology**, v.68, p.804-812, 2007.
- MULLEN, S.F.; CRITSER, J.K. **The Science of Cryobiology**, in: Woodruff TK, Snyder KA (Eds.), Oncofertility Fertility Preservation for Cancer Survivors. Springer, pp.83-109, 2007.
- NAGASE, H.; TOMIZUCA, T.; HANADA, A.; HOSODA, T.; MORIMOTO, H. Cryoprotective action of some amides on spermatozoa of domestic animals. I. Effects of formamide, acetamide and lactamide on the motility of bovine spermatozoa after pellet freezing. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v.18, n.1, p.15-21, 1972.
- NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERUMAN, H. T. **Cryobiology**. New York: Academic Press., p.179-220, 1966.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios da Bioquímica**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, p.1298.
- OLDENHOF, H.; FRIEDEL, K.; AKHOONDI, M.; GOJOWSKY, M.; WOLKERS, W.F.; SIEME, H. Membrane phase behaviour during cooling of stallion sperm and its correlation with freezability. **Molecular Membrane Biology**, v.29, p.95-106, 2012.
- OLDENHOF, H.; AKHOONDI, M.; SIEME, H.; WOLKERS, W.F. Use of Fourier transform infrared spectroscopy to determine optimal cooling rates for cryopreservation of cells. **Biomedical Spectroscopy and Imaging**, v.2, p.83-90, 2013.
- OLDENHOF, H.; HEUTELBECK, A.; BLASSE, A.K.; BOLLWEIN, H.; MARTINSSON, G.; WOLKERS, W.F.; SIEME, H. Tolerance of spermatozoa to hypotonic stress: role of membrane fluidity and correlation with cryosurvival. **Reproduction, Fertility and Development**, v.27, p.285-293, 2015.
- OLDENHOF, H.; BIGALK, J.; HETTEL, C.; BARROS, L.O.; SYDYKOV, B.; BAJCSY, A.C.; SIEME, H.; WOLKERS, W.F. Stallion Sperm Cryopreservation Using Various Permeating Agents: Interplay Between Concentration and Cooling Rate. **Biopreservation and Biobanking**, v.15, p.1-10, 2017.
- OLIVEIRA, G.C.; OLIVEIRA, B.M.M.; CALEGHINI, E.C.C.; FERNANDES, C.B.; MATTOS, C.B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, p.23-28, 2013.
- OLIVEIRA, S.N. **Efeito da colheita fracionada sobre a cinética e viabilidade espermática do sêmen refrigerado e congelado de garanhões**. Botucatu, 2016. 103p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL’AQUA Jr, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.184-187, 2002.

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

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

PEÑA, F.J.; GARCÍA, B.M.; SAMPER, J.C.; APARICIO, I.M.; TAPIA, J.A. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology** v.76(7), p.1177-1186, 2011.

PICKETT, B.W.; KOMAREK, R.J. Effect of cold shock and freezing on loss of lipid from spermatozoa. **Journal Dairy Science** v.50, p.753-757, 1967.

PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation. In: **Techniques For Freezing Mammalian Embryos**, 1986. Proceedings... For Collins: Colorado States University, 1986. P.1-5.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164: p.666, 1949.

POLGE, C.; ROWSON, L.E.A. Fertilizing Capacity of Bull Spermatozoa after Freezing at -79°C . **Nature**, v.169, p.626-627, 1952.

PRIEN, S.; IACOVIDES, S. Cryoprotectants & Cryopreservation of Equine Semen: A Review of Industry Cryoprotectants and the Effects of Cryopreservation on Equine Semen Membranes. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v.3, n.1, p.63, 2016.

PUKAZHENTHI, B.S; JOHNSON, A; GUTHRIE, H.D; SONGSASEN, N; PADILLA, L.R; WOLFE, B.A; SILVA, M.C; ALVARENGA, M.A; WILDT, D.E. Improved sperm cryosurvival in diluents containing amides versus glycerol in the Przewalski’s horse (*Equus ferus przewalskii*). **Cryobiology**, v.68, p.205-214, 2014.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.6, p.215-225, 2006.

RAHA, S.; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, p.502-508, 2000.

- ROBERTSON, J.D. Membrane structure. **The Journal of Cell Biology**, v.91, p.189-204, 1981.
- RODRIGUEZ, A.M; FERRUSOLA, C.O; MACIAS, B; MORRELL, J.M; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H; TAPIA, J.A. PEÑA, F.J. Freezing stallion sperm with the new Cáceres extender improved post thaw sperm quality and diminishes stallion-tostallion variability. **Animal Reproduction Science**, v.127, p.78-83, 2011.
- RODRIGUEZ, A.M.; SILVA, C.B.; GARCÍA, B.M.; BOLANOS, J.M.G.; TAPIA, J.A.; APARICIO, I.M.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; PENA, F.J. Dimethylformamide Improves the In vitro Characteristics of Thawed Stallion Spermatozoa Reducing Sublethal Damage. **Reproduction in Domestic Animals**. v.47, p.995-1002, 2012.
- ROYERE, D.; BARTHELEMY, C.; HAMAMAH, S.; LANSAC, J. Cryopreservation of spermatozoa: a review. **Human Reproduction**, v.2(6), p.553-559, 1996.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62(1-3), p.77-111, 2000.
- SALAZAR Jr., J.L.; TEAGUE, S.R.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Effect of cryopreservation protocol on post thaw characteristics of stallion sperm. **Theriogenology**, v.76, p.409-418, 2011.
- SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. **Science** v.283, p.1488-1493, 1999.
- SEIDEL, G.E. **Principles of cryopreservation of mammalian embryo**. In: The techniques for freezing mammalian embryos, 1986, Fort Collins. Colorado States University, 1986. p.6-12.
- SCOTT, J.W. Lipid metabolism of spermatozoa. **Journal Reproduction and Fertility**, v.18(Suppl), p.65-76, 1973.
- SILVA, L.F.M.C. 2016. **Estudo sobre a redução do estresse oxidativo em sêmen equino a partir da adição de quercetina nos diluentes de refrigeração e congelação**. Master Thesis. University of São Paulo State-UNESP, Botucatu, 100pp.
- SMITH, A.U.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. *Nature* v.166, p.668-669, 1950.
- SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.L.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. **Cooled and Frozen Stallion Semen. Fort Collins: animal Reproduction and Biotechnology laboratory, 1999**. (Apostila).
- SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1056-1065, 2004.

- STRYER, L. **Introdução ao estudo das membranas biológicas**. In Bioquímica. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. Cap.12, p.230-256.
- SZTEIN, J.M.; TAKEO, T.; NAKAGATA, N. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v.82, p.57-63, 2018.
- TARVIS, K.M. **New methods for cryopreserving rooster spermatozoa**. Colorado State University Fort Collins, Colorado Spring 2013.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results, **Theriogenology**, v.48, p.907-917, 1997.
- VIDAMENT, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.115-136, 2005.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P.; LOVE, C.C.; TAYLOR, T.S.; JOHNSON, L. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.493-509, 2000.
- VARNER, D.; JOHNSON, L. From a Sperm's View – Revisiting Our Perception of This Intriguing Cell. **AEEP Proceedings**, v.53, p.104-177, 2007.
- VARNER, D.D.; GIBB, Z.; AITKEN, R.J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v.47, p.16-24, 2015.
- WATSON, P.F. 1981: **The effects of cold shock on sperm cell membranes**. In: Morris GJ, Clark A (eds), Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. Academic Press, London, pp. 189–218.
- WOLKERS, W.F; OLDENHOF, H; TANG, F; HAN, J; BIGALK, J; SIEME, H. Factors Affecting the Membrane Permeability Barrier Function of Cells during Preservation Technologies. **Langmuir**, v.35, p.7520-7528, 2019.
- WOWK, B.; DARWIN, M.; HARRIS, S.B.; RUSSEL, S.R.; RASH, C.M. Effects of solutes methoxilation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions. **Cryobiology**, v.39, p.215-27, 1999.
- YANAGIMACHI, R. 1994. **Mammalian fertilization**. In **The Physiology of Reproduction**, 2nd edn, ed. Knobil, E & Neill, JD, pp. 189–317. New York: Raven Press.
- YAVIN, S.; ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification Solutions. **Theriogenology**, v. 67 p.81-89, 2007.

ZHANG, X.H.; CATALANO, P.N.; GURKAN, U.A.; KHIMJI, I.; DEMIRCI, U. Emerging technologies in medical applications of minimum volume vitrification. **Nanomedicine**, v.6(6), p.1115-1129, 2011.

ZHAO, G.; JIANPING, F. Microfluidics for Cryopreservation. **Biotechnol Adv.** v.35, n.2, p.323-336, 2017.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina**. Botucatu, 1998. 121p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

HIPÓTESE

Diferentes curvas positivas de refrigeração até 5°C com ou sem tempo estabilização, podem trazer benefício e diminuir os danos osmóticos causado pelos crioprotetores durante a criopreservação do sêmen em equinos. A passagem mais lenta pela fase de transição lipídica, entre a fase em que as células se encontram em um estado líquido para a fase semelhante ao gel, possa diminuir as chances de choque osmótico.

OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes curvas de refrigeração e crioprotetores.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se diferentes curvas com taxas de refrigeração mais rápidas ou mais lentas, influenciam na viabilidade espermática, avaliadas por meio dos parâmetros do CASA, desestabilização da membrana e potencial mitocondrial através da citometria de fluxo.
- Avaliar o efeito de diferentes crioprotetores: glicerol e as amidas de forma individual na concentração de 5%, em diferentes curvas de refrigeração, sobre a cinética espermática, integridade de membrana plasmática e potencial mitocondrial dos espermatozoides de garanhões pós-descongelamento.

CAPÍTULO II

Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2015. <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>

Efeito do glicerol e amidas em diferentes curvas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen congelado equino

Sidnei N. Oliveira^{1*}, Frederico O. Papa¹

¹ Sao Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu, Brazil

*corresponding author

E-mail: sidneino@gmail.com

Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes curvas de refrigeração com ou sem período de estabilização e a ação dos crioprotetores glicerol, metilformamida, dimetilformamida e dimetilacetamida, sobre a congelação do sêmen equino. Quarenta e oito ejaculados (n=6 garanhões) foram utilizados, cada ejaculado foi dividido em quatro alíquotas cada uma diluída 1:1 com BotuSêmen[®], centrifugada a 600 x g por 10min. O “pellet” ressuspendido com o diluente a base de gema de ovo (BotuCrio[®]) acrescido com diferentes crioprotetores: glicerol (GLY), metilformamida (MF), dimetilformamida (DMF) e dimetilacetamida (DMA), na concentração de 5%, na concentração de 100x10⁶ spz totais, envasado em palhetas de 0.5mL e, em seguida submetidas a quatro curvas de refrigeração: 1°C/min⁻¹, 0,25°C/min⁻¹, 4°C/min⁻¹ com estabilização à 5°C de 15min e 75min, através do sistema Mini-Digitcool ZH 400. Logo após, as palhetas foram congeladas em vapor de nitrogênio na curva de ~25°C/min⁻¹ até ~-140°C, imersas em nitrogênio líquido e descongeladas a 46°C por 20s. A cinética espermática análise através do CASA, membrana plasmática e potencial mitocondrial por meio da citometria de fluxo. O GLY apresentou maior motilidade progressiva em comparação as amidas (P<0.05). A MF, apresentou melhores resultados em comparação com as demais amidas avaliadas na motilidade progressiva (P<0.05). O potencial mitocondrial foi maior para o sêmen criopreservado com GLY em comparação com as amidas (P<0.05). Entretanto, a

35 dimetilformamida apresentou maiores resultados de integridade de membranas em
 36 comparação aos demais crioprotetores ($P < 0.05$). A curva de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ entre 25° a 5°C
 37 apresentou maiores resultados que as curvas a $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ na cinética espermática,
 38 integridade de membrana e potencial mitocondrial ($P < 0.05$). Nas quatro diferentes curvas
 39 a motilidade progressiva do sêmen criopreservado com GLY foi maior que DMF. Além
 40 disso, a DMF obteve maiores resultados de integridade de membranas em comparação ao
 41 GLY nas curvas $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ e $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ ($P < 0.05$). Em conclusão, pode se afirmar que
 42 o crioprotetor com melhores resultados de motilidade progressiva e potencial
 43 mitocondrial foi o GLY e a DMF foi o crioprotetor que mais preservou a membrana.
 44 Além disso, na interação entre todos os parâmetros avaliados a melhor curva foi $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$.
 45

46
 47 **Palavras-chaves:** Garanhão, espermatozoide, cinética espermática, potencial
 48 mitocondrial, integridade de membrana.

50 1. Introdução

51
 52 Nos últimos anos a utilização do sêmen congelado de garanhões em programas de
 53 inseminação artificial tem sido cada vez mais frequente. Entretanto, ainda existem
 54 grandes variações nos resultados, na qualidade do sêmen descongelado e na taxa de
 55 fertilidade entre diferentes garanhões [1, 2, 3, 4, 5, 6], diluentes e crioprotetores [2, 6, 7,
 56 8], tempo e temperatura de refrigeração e taxa de descongelação utilizada [9, 10, 11, 12].

57 Sabe-se que diferentes extensores comerciais preconizam diferentes curvas
 58 positivas de refrigeração para a congelação de células espermáticas de garanhões,
 59 existindo uma variação de taxas de refrigeração discrepante na literatura (entre $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$
 60 ¹ a $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$), reportadas por diferentes autores [1, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,
 61 18, 19, 20, 21, 22].

62 Um dos pontos críticos do processo de congelação, onde ocorrem as primeiras
 63 lesões a célula espermática é durante o processo de refrigeração entre a temperatura
 64 ambiente (25°C) até 5°C . Nesta fase, a membrana celular sofre modificações em sua
 65 estrutura, passando do estado líquido cristalino para uma forma semelhante ao gel,
 66 denominada de fase de transição da membrana [23, 24, 25].

67 A membrana plasmática dos espermatozoides do garanhão está na fase fluida a
 68 37°C e, a fluidez diminui com o decréscimo da temperatura, passando por uma fase ampla

69 de transição entre 30°C e 10°C [17, 25, 26]. Neste momento, ocorre a reorganização
70 estrutural e alterações na orientação dos fosfolipídios, induzindo rearranjos como a fase
71 hexagonal-II, consequentemente pode causar fragilidade excessiva e até rupturas das
72 membranas [27, 28], abaixo de 15°C é quando os gametas masculino dos equinos
73 apresentam maiores lesões da membrana, sendo esta temperatura considerada crítica para
74 a sobrevivência espermática [26].

75 Outro acontecimento físico que acontece na criopreservação é a osmose,
76 caracterizada como o movimento da água de um ambiente de baixa concentração de
77 soluto para um ambiente de alta concentração de soluto [29]. Mais especificamente, os
78 espermatozoides possuem uma osmolaridade em torno de $\sim 300\text{mOsm/Kg H}_2\text{O}$ enquanto
79 os diluentes de congelação possuem aproximadamente $\sim 1200\text{mOsm/Kg H}_2\text{O}$
80 (dependendo da concentração e do crioprotetor utilizado), assim, durante a adição desses
81 diluentes contendo crioprotetores, existe uma dissipação da água do meio intra para o
82 extracelular. Esse transporte pode ser de forma passiva ou ativa envolvendo as proteínas
83 dos canais iônicos [16, 30]. Possivelmente, essas trocas ocorrem até o limite de tolerância
84 osmótica das células [26, 31], sendo assim, quando as células encolhem além do limite
85 de tolerância osmótica, pode ocorrer danos irreversíveis a membrana celular e
86 comprometer a sua sobrevivência [26].

87 O ponto de congelação de uma solução, depende da concentração de soluto no
88 meio, a água congela a 0°C, já o citoplasma das células congela abaixo de -1°C, diluentes
89 de congelação têm seu ponto de congelação em temperaturas mais baixas ($\sim -10^\circ\text{C}$),
90 devido a presença dos crioprotetores. Durante a passagem pela curva negativa de
91 congelação, ocorre formação de cristais de gelo extracelular, há um aumento da
92 concentração de solutos extracelular, os espermatozoides são expostos a condições
93 hiperosmótica resultando no transporte da água de dentro do citoplasma para o meio
94 extracelular, desta forma, ocorre desidratação da célula, até o ponto eutético (-80°C) [6,
95 9, 32]. Ao longo desta passagem críticas das células (até -60°C), a curva de congelação
96 exerce um importante papel para minimizar os possíveis danos celulares. Sendo assim, a
97 curva de congelação deve ter uma velocidade ideal para não desidratar as células
98 demasiadamente e velocidade o suficiente para evitar a formação de grandes cristais de
99 gelo intracelular [6, 9, 33, 34].

100 Diluentes comerciais de congelação possuem formulações distintas, diferentes
101 tipos e concentração de crioprotetores, assim como, variados resultados pós-
102 descongelação são evidenciados na literatura para o sêmen equino [8, 12, 18, 20, 21, 35,

103 36]. A capacidade de uma molécula exercer a função de crioprotetor e ser eficaz, depende
104 tanto da sua capacidade de proteger as células dos danos causados pela congelação,
105 quanto da sua baixa toxicidade para as células espermáticas [7].

106 Quimicamente, o GLY é conhecido por realizar ligação em três grupos hidroxilas
107 funcionais, cada um dos quais pode aceitar um hidrogênio da molécula de água a seis
108 diferentes locais de ligação [37], além de apresentar uma molécula com peso molecular
109 maior em relação às amidas [7]. O principal fator limitante ao uso do glicerol em equinos
110 é a indução de danos osmóticos às células espermáticas [6, 27, 31, 38, 39]. Por outro lado,
111 as amidas (MF, DMF e DMA) estão sendo estudadas, como uma alternativa para
112 minimizar os danos osmóticos [1, 2, 6, 7, 13, 14, 20, 40, 41].

113 No entanto, não foi encontrado na literatura estudos com a finalidade de avaliar
114 diferentes curvas de refrigeração para crioprotetores distintos. Neste sentido, o objetivo
115 do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes curvas de refrigeração com ou sem
116 período de estabilização e a ação dos crioprotetores glicerol, metilformamida,
117 dimetilformamida e dimetilacetamida, em relação a congelação do sêmen equino.

118

119 **2. Material e Métodos**

120

121 Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos na Sigma-Aldrich,
122 St. Louis, MO.

123

124 *2.1. Animais e local da pesquisa*

125

126 Este estudo foi conduzido durante o período de novembro de 2019 a fevereiro de
127 2020 (durante a estação de monta do hemisfério sul) na Faculdade de Medicina
128 Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
129 (FMVZ) Unesp – Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil (latitude 22° 53’ S, longitude
130 48° 26’ W, altitude 840 m). Para realização do experimento utilizou-se seis garanhões, de
131 diferentes raças (Mangalarga Machador, Quarto de Milha e Crioulo) e com idade entre
132 quatro e 18 anos, os garanhões ficaram em baias individuais (5 x 5m) e eram soltos
133 durante 2 h por dia em piquetes (25 x 25m) sem acesso direto a águas. A alimentação era
134 a base de feno de tifton (*Cynodon spp.*) e suplementados com 3Kg/dia de ração comercial
135 balanceada contendo 12% de proteína (GuabiTech Beet[®], Guabi Nutrição e Saúde

Animal, Campinas, SP, Brasil). Os animais tiveram acesso livre a água e sal mineral quando estavam em baias assim como nos piquetes.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética e experimentação animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ) Unesp – Campus de Botucatu, São Paulo, Brasil (nº 0174/2017-CEUA).

2.2. Colheita e avaliação seminal

Os animais tiveram o ejaculado colhidos três vezes com um intervalo de um dia para esgotar as reservas extra gonadais, antes do início do experimento. Após esse período, cada garanhão teve a colheita do sêmen realizada por meio de uma vagina artificial (modelo Botucatu, Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil) preenchida com água quente a 45°C, em um manequim na presença de uma égua no cio. Após a colheita, o ejaculado foi filtrado em filtro de nylon para remoção da fração gelatinosa e o volume foi mensurado. A concentração espermática foi determinada através do hematocítômetro. A cinética espermática inicial foi avaliada em sistema computadorizado (HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12) no qual avaliou-se a motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%) e número de espermatozoides rápidos (RAP%). Para isso, o *setup* utilizado nas avaliações, tinham as seguintes configurações. Apresentava captura de imagem (frames por segundo: 60Hz), captura de imagem (número de frames: 30), células detectadas (mínimo de contraste: 30), células detectadas (mínimo de 30 pixels), padrão (mínimo por células de 5 pixels), padrão (intensidade celular: 40). Para ser consideradas com motilidade progressivas as células tiveram que apresentar no mínimo 70µm/s de velocidade média da trajetória (VAP) e 80% de progressividade (STR), células que apresentavam movimento lento abaixo de 30µ/s VAP e 20µ/s velocidade linear progressiva (VSL), foram consideradas estáticas, segundo Carneiro et al. [42]. Somente forma utilizados ejaculados com no mínimo 70% de MT e 30% de MP após as colheitas.

170 2.3. Criopreservação do sêmen

171

172 Para realização deste estudo, utilizou-se 48 ejaculados. Imediatamente após a
173 concentração, foram separados quatro alíquotas em tubo de centrifuga de 15 mL, cada
174 uma foi diluída 1:1 (v/v) com o diluente a base de leite (BotuSêmen®, Botupharma®,
175 Botucatu, SP, Brasil), centrifugada a 600 x g em centrifuga (Baby I 206 BL, Fanem®,
176 Guarulhos, SP, Brasil) por 10 min. Posteriormente, desprezado o sobrenadante e o
177 “pellet” ressuspendido com diluente comercial a base de gema de ovo (Botu-Crio®,
178 Botupharma®, Botucatu-SP, Brasil) acrescido com 5% de diferentes crioprotetores:
179 glicerol, metilformamida, dimetilformamida e dimetilacetamida. As amostras foram
180 então envasadas em palhetas de 0,5 mL na concentração de 100×10^6 sptz totais e lacradas
181 com álcool polivinílico. As palhetas de cada um dos grupos (GLY, MF, DMF e DMA)
182 foram submetidas à quatro diferentes curvas de refrigeração sendo elas: Curva 1 (C1):
183 velocidade de $1^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$ entre 25°C e 5°C ; Curva 2 (C2): velocidade de $0,25^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$
184 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
185 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
186 estabilização à 5°C (Figura 1). Para isso, foi utilizado o sistema automático da Mini-
187 Digitcool ZH 400 (IMV Technology, L’Aigle, France), o equipamento foi programado
188 de acordo com as recomendações do fabricante. Após a realização das diferentes curvas
189 de refrigeração automatizadas, as palhetas foram submetidas a curva de congelação pelo
190 método tradicional segundo Papa et al. [8], caixa de isopor com capacidade para 45 litros,
191 preenchida com nitrogênio líquido (LN_2) até a marca de 3,5 cm de altura, as palhetas
192 ficaram dispostas horizontalmente 4,0cm acima do nível do nitrogênio líquido por 20
193 minutos em vapor de LN_2 em curva média $\sim 25^\circ\text{C}/\text{min}^{-1}$ até atingir uma temperatura de
194 $\sim -140^\circ\text{C}$, após este período, imersas em LN_2 e armazenadas em botijão criobiológico
195 para posteriores avaliações.

196

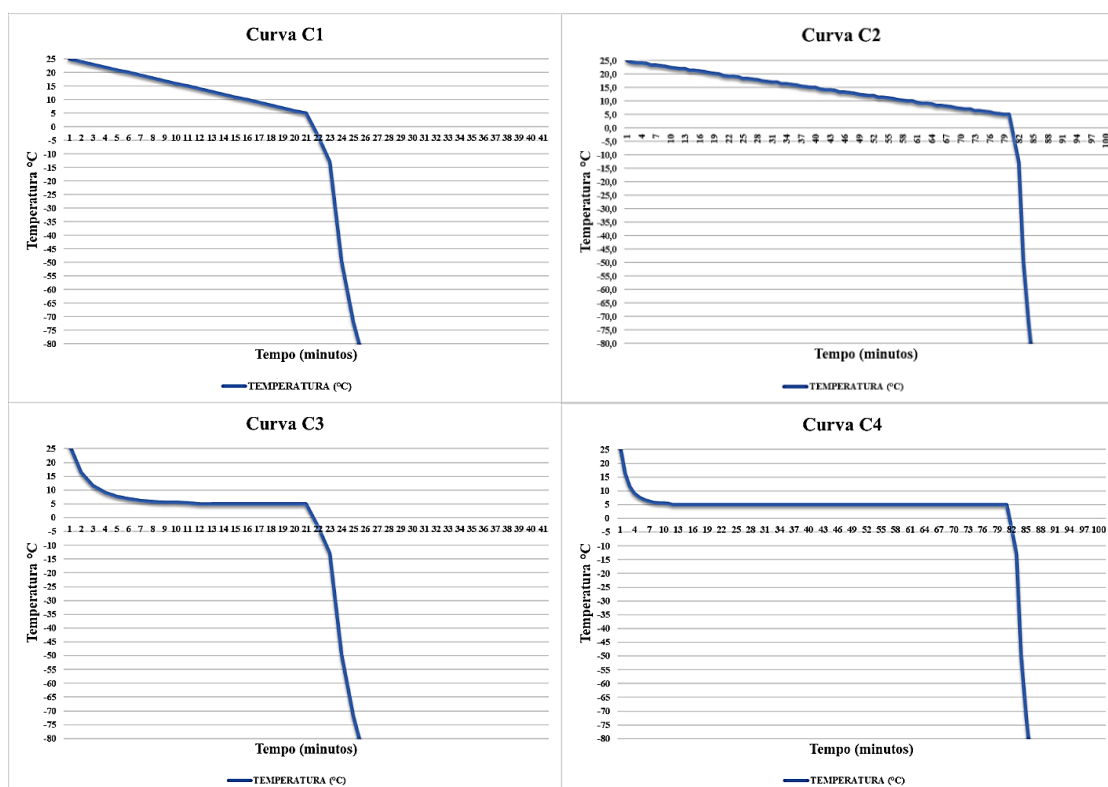


Figura 1. Representação gráfica das diferentes curvas de refrigeração (C1): velocidade de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ entre 25°C e 5°C ; Curva 2 (C2): velocidade de $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ entre 25°C e 5°C ; Curva 3 (C3): $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ entre 25°C à 5°C mantido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

2.4. Avaliações pós-descongelamento

2.4.1. Cinética espermática

Para que as avaliações fossem realizadas, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 46°C por 20 segundos [11], transferidas para um minitubo plástico (eppendorf) de 2,0 mL e mantidas a 37°C por 10 min e avaliadas em seguida.

As amostras foram avaliadas após a descongelamento em sistema computadorizado CASA (HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12), nos seguintes parâmetros: espermatozoides com motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), espermatozoides rápidos (RAP%) velocidade média da trajetória ($\text{VAP}\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva ($\text{VSL}\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea ($\text{VCL}\mu\text{m/s}$), amplitude lateral de cabeça ($\text{ALH}\mu\text{m}$), progressividade (STR%), linearidade (LIN%). Para cada amostra de sêmen foram observados cinco campos aleatórios em câmara de Mackler, avaliando-se respeitando um número mínimo de 200 células por campo.

220

221 *2.4.2. Citometria de fluxo*

222

223 Para a avaliação espermática por citometria de fluxo foi utilizado o equipamento
 224 BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers
 225 de excitação: azul 488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30nm e 695/40nm; vermelho
 226 640-nm, 40 mW com filtro 660/20nm; e o violeta 405-nm, 100 mW, com o filtro
 227 450/50nm. No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados foram
 228 avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1. Assim as amostras foram
 229 diluídas em TALP-PVA (Parrish et al. [43] modificado: 100mM NaCl, 3,1mM KCl,
 230 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0mM CaCl₂,
 231 0,4mM MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de sódio, 1,0mg/mL
 232 álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina) na concentração de
 233 5x10⁶ espermatozoides/mL

234

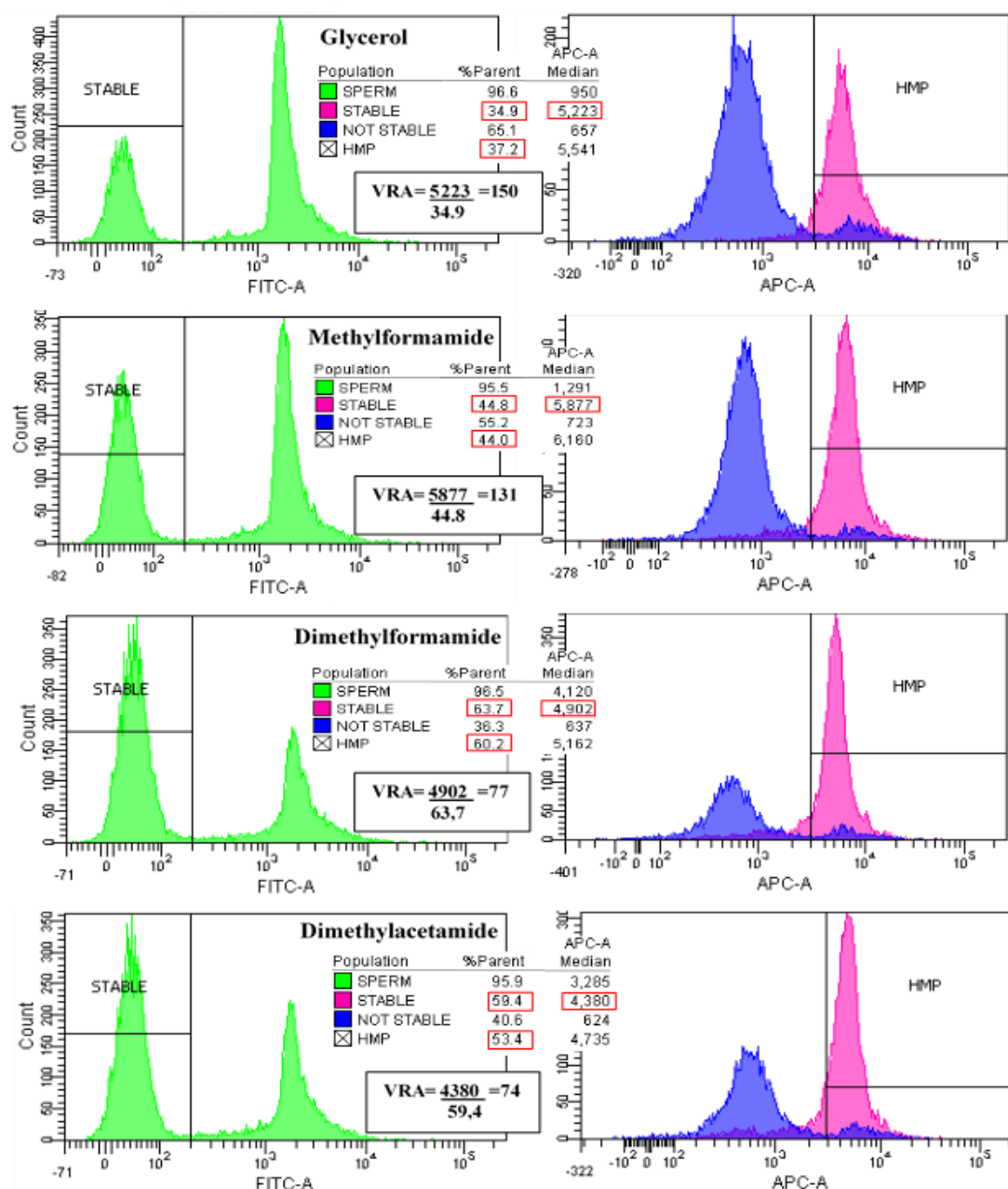
235 *2.4.2.1. Estabilidade da membrana plasmática e potencial Mitocondrial*

236

237 Para avaliação do potencial mitocondrial e desestabilização de membrana, foi
 238 utilizada a associação de Hoechst 33342, Yopro (YP; marcação para célula com
 239 membrana plasmática desestabilizada) e MitoStatus Red (MST; potencial mitocondrial).
 240 Assim em uma amostra de 500µL de sêmen diluído foi adicionado 7µM Hoechst 33342,
 241 25nM YP e 20µM de MST, incubada a 37°C por 20 minutos. Os parâmetros utilizados
 242 para a análise foram porcentagem de células com membrana plasmática estável (células
 243 YOPRO negativas; Stable, %), porcentagem de células com alto potencial mitocondrial
 244 (células que exibiram alta fluorescência de MST%) e, a intensidade de fluorescência
 245 emitida apenas pelas células com membrana plasmática estável como método qualitativo
 246 do potencial mitocondrial (células YOPRO negativas que emitiram alta fluorescência de
 247 MST AU) de acordo com a figura 2. Além disso, foi calculado um valor referência
 248 ajustado (VRA) da mediana do potencial mitocondrial das células com membrana
 249 plasmática estável pela porcentagem dessas células, conforme formula a seguir:

$$\text{VRA} = \frac{\text{Mediana Potencial Mitocondrial}}{\text{Porcentagem células membrana estável}}$$

250



251

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

2.5. *Análise estatística*

Distribuição normal dos dados e homocedasticidade foram avaliadas empregando o teste de Shapiro Wilk e Barlett, respectivamente. A comparação entre as variáveis foi realizada empregando o teste ANOVA (Proc GLM) considerando como efeito fixo a curva de congelamento e o crioprotetor assim como a sua interação. Os resultados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão, diferença estatística significativa foi considerada quando $P < 0.05$. As análises foram realizadas empregando o pacote estatístico SAS Version 9.1, (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3. Resultados

O sêmen criopreservado com DMF apresentou um percentual mais alto ($P < 0.05$), de motilidade total nas curvas C1 e C2, em relação a DMA, não diferindo dos demais crioprotetores. Neste mesmo parâmetro, não houve diferença entre as curvas C3 e C4 entre os diferentes crioprotetores, assim como, os crioprotetores avaliados individualmente em diferentes curvas não mostraram diferença significativa no parâmetro de motilidade total nas quatro diferentes curvas (C1, C2, C3 e C4). O número de espermatozoides rápidos, diferiu ($P < 0.05$) apenas nas curvas C1 e C2 para os crioprotetores GLY, MF e DMF, respectivamente em relação ao DMA, entretanto não houve diferença ($P > 0.05$) nas diferentes curvas para cada um dos crioprotetores avaliados. A motilidade progressiva diminuiu significativamente ($P < 0.05$) para a DMA e DMF nas quatro diferentes curvas avaliadas em comparação com o GLY sendo que nas curvas C3 e C4, o GLY apresentou valores superiores de motilidade progressiva em comparação com todas as amidas. Entre as amidas, a motilidade progressiva da MF, foi significativamente superior a DMF e DMA nas curvas C1 e C2 e não diferiu nas curvas C3 e C4 ($P > 0.05$). Avaliando-se as curvas individualmente para cada um dos crioprotetores, apenas a MF mostrou diferença entre as curvas C1 e C2 em comparação a C3 e C4, os demais crioprotetores não mostraram diferença entre as quatro diferentes curvas avaliadas. Todos esses resultados encontram-se na Tabela 1.

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

Variáveis	Curvas	Crioprotetores			
		GLY	MF	DMF	DMA
Motilidade total (%)	C1	58±16 ^{ab}	63±7 ^{ab}	68±4 ^a	51±9 ^b
	C2	54±17 ^{ab}	60±12 ^a	63±6 ^a	47±20 ^b
	C3	57±20 ^a	54±15 ^a	53±10 ^a	52±13 ^a
	C4	59±18 ^a	57±15 ^a	54±8 ^a	51±15 ^a
Motilidade progressiva (%)	C1	31±12 ^a	27±7 ^{aA}	20±6 ^b	6±5 ^c
	C2	24±14 ^a	25±14 ^{aA}	18±9 ^b	9±7 ^b
	C3	28±14 ^a	15±8 ^{bB}	14±3 ^b	12±5 ^b
	C4	27±13 ^a	17±17 ^{bB}	14±6 ^b	10±5 ^b
Número de espermatozoides rápidos (%)	C1	43±17 ^a	45±11 ^a	45±3 ^a	16±11 ^b
	C2	36±19 ^a	39±19 ^a	37±10 ^a	19±15 ^b
	C3	39±20 ^a	30±16 ^b	34±9 ^b	31±14 ^b
	C4	41±21 ^a	30±16 ^b	34±7 ^b	28±14 ^b

C1: Curva de 1°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C; C2: Curva de 0,25°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C; C3: Curva de 4°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C mantido por + 15 min de estabilização à 5°C; C4: Curva de 4°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C mantido por + 75 min de estabilização à 5°C.

GLY: glicerol; MF: metilformamida; DMF: dimetilformamida; DMA: dimetilacetamida.

^{abc}letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença $P<0.05$.

^{ABC}letras maiúsculas diferentes na mesma coluna antes dos intervalos significam diferença $P<0.05$.

As avaliações realizadas através da citometria de fluxo resultaram nos seguintes parâmetros: o percentual de células com membrana plasmática estabilizada pós-descongelação foi significativamente maior ($P<0.05$), para as amidas DMF e DMA em comparação ao GLY na curva C1 e C2 respectivamente, não havendo diferença entre as amidas e o GLY nas demais curvas ($P>0.05$). A DMF e DMA demonstraram superioridade na estabilidade da membrana plasmática nas curvas C1 e C2 em comparação com C3 e C4 ($P<0.05$). Quando os espermatozoides foram criopreservados com o crioprotetor GLY maiores resultados de alto potencial mitocondrial foram observados em comparação com as amidas MF, DMF e DMA na curva C1, C2, C3 e C4, respectivamente ($P<0.05$). Quando foram comparadas as curvas de forma individual para cada um dos crioprotetores (GLY, MF, DMF e DMA), houve um decréscimo significativo no potencial da mitocôndria ($P<0.05$), na ordem de C1>C2>C3>C4, respectivamente. Todos esses resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Valores pós-descongelamento 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.

Variáveis	Curvas	Crioprotetores			
		GLY	MF	DMF	DMA
PME (%)	C1	37±7 ^b	44±10 ^b	62±7 ^{aA}	57±6 ^{aA}
	C2	41±10 ^b	44±7 ^{ab}	56±6 ^{aA}	51±6 ^{aA}
	C3	39±8	39±9	47±8 ^B	39±11 ^B
	C4	38±10	37±9	40±9 ^B	39±10 ^B
HPM (UA)	C1	8039±1036 ^{aA}	6787±1157 ^{bA}	6077±978 ^{bA}	6547±850 ^{bA}
	C2	5350±1023 ^{aB}	4966±556 ^{bB}	4669±920 ^{bB}	4321±1343 ^{bB}
	C3	2515±1111 ^{aC}	2046±864 ^{bC}	2004±1085 ^{bC}	1959±1060 ^{bC}
	C4	2505±1102 ^{aC}	2040±862 ^{bC}	1996±1050 ^{bC}	1908±1010 ^{bC}

C1: Curva de 1°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C; C2: Curva de 0,25°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C; C3: Curva de 4°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C mantido por + 15 min de estabilização à 5°C; C4: Curva de 4°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C mantido por + 75 min de estabilização à 5°C.

GLY: glicerol; MF: metilformamida; DMF: dimetilformamida; DMA: dimetilacetamida.

PME (%): membrana plasmática com estabilidade; HPM: alto potencial mitocondrial. UA: unidade arbitrária.

^{abc}letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença $P<0.05$.

^{ABC}letras maiúsculas diferentes na mesma coluna antes dos intervalos significam diferença $P<0.05$.

Os resultados das avaliações após a descongelamento do sêmen criopreservado com diferentes crioprotetores, demonstram que glicerol, metilformamida e dimetilformamida apresentam resultados superiores a dimetilacetamida em MT e RAP ($P<0.05$). Pode-se observar que a MP para o sêmen criopreservado com glicerol foi maior ($P<0.05$), em comparação ao sêmen criopreservado com as amidas (metilformamida, dimetilformamida e dimetilacetamida). Os achados de MP para as amidas, revelaram diferença estatística ($P<0.05$) entre metilformamida vs dimetilformamida, metilformamida vs dimetilacetamida e dimetilformamida vs dimetilacetamida. Para os outros parâmetros avaliados através do CASA, em geral, as características da cinética dos espermatozoides, foram melhor preservadas quando da utilização dos crioprotetores glicerol e metilformamida. O percentual de células com membrana plasmática estável diferiu significativamente ($P<0.05$) entre a dimetilformamida vs dimetilacetamida, metilformamida e glicerol; dimetilacetamida vs metilformamida e glicerol. O glicerol demonstrou diferença no alto potencial mitocondrial quando comparado a

metilformamida, dimetilformamida e dimetilacetamida ($P<0.05$). Todos esses resultados encontram-se na Tabela 3.

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

Crioprotetores				
Parâmetros	GLY	MF	DMF	DMA
Motilidade total (%)	58±18 ^a	58±13 ^a	60±10 ^a	51±15 ^b
Motilidade progressiva (%)	28±13 ^a	21±13 ^b	17±7 ^c	9±6 ^d
Espermatozoides rápidos (%)	40±19 ^a	36±17 ^a	38±9 ^a	23±15 ^b
VAP (µm/s)	82±11 ^{ab}	79±10 ^b	85±8 ^a	71±14 ^c
VSL (µm/s)	68±9 ^a	61±9 ^b	61±6 ^b	52±9 ^c
VCL (µm/s)	147±13 ^b	151±13 ^b	159±12 ^a	137±22 ^c
ALH (µm)	6,0±0,4 ^a	7,0±0,6 ^c	7,0±0,4 ^c	6,7±0,7 ^c
STR (%)	83±3 ^a	76±3 ^b	75±3 ^c	75±2 ^c
LIN (%)	48±3 ^a	40±4 ^b	41±2 ^b	38±2 ^c
PME (%)	39±9 ^c	41±9 ^c	51±11 ^a	46±11 ^b
HPM (UA)	4504±2472 ^a	4015±2377 ^b	3709±1961 ^b	3719±2186 ^b

GLY: glicerol; MF: metilformamida; DMF: dimetilformamida; DMA: dimetilacetamida. VAP (µm/s): velocidade média da trajetória; VSL (µm/s): velocidade linear progressiva; VCL (µm/s): velocidade curvilínea, ALH (µm): amplitude lateral de cabeça; STR (%): progressividade; LIN (%): linearidade; PME (%): membrana plasmática com estabilidade; HPM: alto potencial mitocondrial. UA: unidade arbitrária.

^{abc}letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença $P<0.05$.

Em relação aos parâmetros de cinética nas diferentes curvas de refrigeração, resultados superiores foram observados na curva de refrigeração C1 para MT e MP ($P<0.05$). Para a amplitude lateral de cabeça e linearidade, as curvas de refrigeração C1 e C2 demonstraram resultados superiores das demais curvas C3 e C4. As curvas C1 e C2 apresentaram superioridade na estabilidade da membrana plasmática em comparação com C3 e C4. Assim como, entre as curvas estudadas, a curva C1 apresentou o mais alto potencial mitocondrial. Todos esses resultados encontram-se na Tabela 4.

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.

Parâmetros	Curvas			
	C1	C2	C3	C4
Motilidade total (%)	60±12 ^a	56±16 ^{ab}	54±15 ^b	55±15 ^b
Motilidade progressiva (%)	21±12 ^a	19±13 ^{ab}	17±11 ^b	17±13 ^b
Espermatozoides rápidos (%)	37±17	33±18	33±16	33±16
VAP (µm/s)	80±14	77±11	81±12	78±11
VSL (µm/s)	60±12	60±10	62±9	59±8
VCL (µm/s)	148±20 ^a	142±17 ^b	153±16 ^a	150±14 ^a
ALH (µm)	6,5±0,7 ^a	6,4±0,7 ^a	6,9±0,5 ^b	6,9±0,7 ^b
STR (%)	78±5	77±5	77±4	77±5
LIN (%)	43±5 ^a	43±4 ^a	40±4 ^b	41±5 ^b
PME (%)	50±13 ^a	48±9 ^a	41±9 ^b	39±10 ^b
HPM (UA)	6858±1230 ^a	4827±1053 ^b	2131±1043 ^c	2112±1010 ^c

C1: Curva de 1°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C; C2: Curva de 0,25°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C; C3: Curva de 4°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C + 15 min de estabilização à 5°C; C4: Curva de 4°C/min⁻¹ entre 25°C à 5°C + 75 min de estabilização à 5°C. MT (%): motilidade total; MP (%): motilidade progressiva; RAP (%): número de espermatozoides rápidos; VAP (µm/s): velocidade média da trajetória; VSL (µm/s): velocidade linear progressiva; VCL (µm/s): velocidade curvilínea, ALH (µm): amplitude lateral de cabeça; STR (%): progressividade; LIN (%): linearidade; PME (%): membrana plasmática com estabilidade; HPM: alto potencial mitocondrial. UA: unidade arbitrária.

^{abc}letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença $P < 0.05$.

A análise visual na tela do CASA mostrou que o sêmen criopreservado com o GLY apresentou um movimento progressivo mais retilíneo que a MF, que mostrou um movimento mais preso, mas melhor em relação a DMF. Sendo assim, os espermatozoides congelados com amidas parecem que se movimentam com maior dificuldade, movimentos oscilatórios e trêmulos. A DMA foi a amida com a mais baixa cinética, movimentos curtos, células letárgicas (Figura 3).

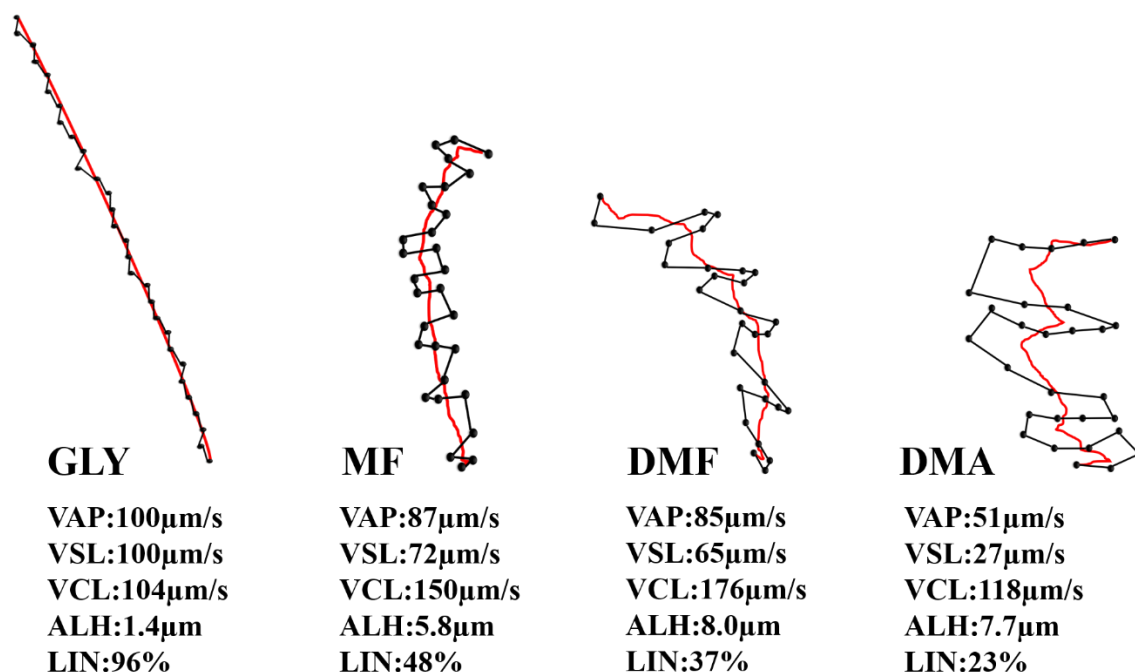


Figura 3. Representação do movimento celular encontrado pós-descongelação do sêmen de garanhão criopreservado com diferentes crioprotetores; glicerol (**GLY**), metilformamida (**MF**), dimetilformamida (**DMF**) e dimetilacetamida (**DMA**). Pontos em cor preta representa a posição da cabeça do espermatozoide 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.

4. Discussão

Comentários gerais

No presente estudo, foram comparadas diferentes curvas de refrigeração para criopreservação do sêmen de garanhões. Para isso, foram utilizados diferentes crioprotetores com grupamento álcool e amidas, assim, foram utilizados o GLY, MF, DMF e DMA em uma concentração de 5%. A criosensibilidade das células espermáticas dos equinos, exibe grande variação na dependência da concentração e tipo de crioprotetor utilizado e taxas de refrigeração durante a congelação [6]. Parece que cada um dos crioprotetores avaliados neste trabalho exerce diferentes ações, nas diferentes curvas de refrigeração, na concentração utilizada e, até mesmo entre as amidas, o grupamento químico pode exercer ações diferentes durante a criopreservação do sêmen equino.

410 *Crioprotetores vs cinética espermática*

411

412 No tocante crioprotetores, independente da curva de refrigeração utilizada, em
413 termos gerais, o GLY foi o crioprotetor que melhor preservou a cinética espermática nesse
414 grupo de animais. Desta forma, a motilidade total para o sêmen criopreservado com GLY
415 apresentou diferentes resultados em relação ao DMA. Quanto ao número de
416 espermatozoides rápidos os resultados foram similares não havendo diferença entre GLY,
417 MF e DMF. Squires et al. [7], demonstrando que a motilidade total foi significativamente
418 superior para o GLY em comparação a acetamida e a metilacetamida por serem amidas
419 moléculas de mesmo grupamento químico que a DMA. Esses achados foram similares
420 aos resultados deste estudo, o GLY foi superior a DMA em todos os parâmetros de
421 cinética espermática independente da curva utilizada. Ainda neste sentido, os autores não
422 encontraram diferença na motilidade total entre MF, DMF e GLY. Contrariamente,
423 Hoffmann et al. [16], encontraram maiores percentuais de motilidade total para o GLY
424 em comparação com a MF e DMF. Diferentes resultados foram reportados por Wu et al.
425 [41] e Medeiros et al. [1], sendo encontrado maiores valores de motilidade total para a
426 MF e DMF em comparação com o GLY. Possivelmente, os diferentes resultados
427 reportados pode ocorrer devido a uma maior criosensibilidade exercida por algum fator
428 genético inerente a raças [2, 44] e/ou grupo de animais “bad freezers” apresentarem baixar
429 resistência a criopreservação possivelmente por apresentar menor composição lipídica da
430 membrana espermática, hipótese justificada por Cabrera et al. [45], sendo GLY
431 prejudicial para esse grupo de animais [1, 41], fato não observado no presente estudo.

432 Independente da curva utilizada, o GLY apresentou resultados superiores para a
433 motilidade progressiva em relação as amidas (MF, DMF e DMA). Wu et al. [41] e Squires
434 et al. [7] reportaram resultados similares, demonstrando que o GLY se mostrou mais
435 efetivo em relação a DMF nesses mesmos parâmetros avaliados. Apesar disso, diferentes
436 resultados foram reportados por Medeiros et al. [1], sendo a MF melhor em comparação
437 aos crioprotetores DMF, DMA e GLY. Deve-se salientar, que a motilidade progressiva é
438 um importante parâmetro a ser levado em consideração quando da utilização do sêmen
439 criopreservado, pois este está diretamente relacionado com a fertilidade do sêmen [46,
440 47]. Em sinergismo com a motilidade progressiva, a velocidade linear progressiva e a
441 linearidade foram superiores para o GLY em comparação com as amidas, assim como, a
442 amplitude lateral de cabeça foi menor em comparação as amidas, independente da curva
443 de refrigeração utilizada.

444 A literatura apresenta variados resultados em cinética espermática pós-
445 descongelação em diferentes crioprotetores do sêmen equino comercialmente conhecidos
446 [1, 2, 6, 7, 14, 20, 41, 48]. No presente trabalho o conjunto de parâmetros de cinética
447 espermática analisados independente da curva de refrigeração utilizada, têm-se que o
448 GLY foi o crioprotetor com movimento celular mais sincrônico, rápido, progressivo e
449 retilíneo, seguido por MF, DMF e DMA. Apesar da DMA ser utilizado em outras espécies
450 como suínos [49, 50], aves [51], ovinos [52], na criopreservação do sêmen de garanhões
451 os resultados de cinética espermática, encontrados no presente estudo não são
452 encorajadores quanto ao seu uso. Foram encontrados menores valores de velocidade na
453 cinética espermática quando da utilização desse crioprotetor, parece haver uma interação
454 negativa no metabolismo celular, mas essa hipótese ainda precisa ser confirmada.

455 Um interessante achado correlacionando as curvas de refrigeração utilizadas com
456 os crioprotetores, mostraram que em todas as curvas o GLY apresentou o maior
457 percentual médio de espermatozoides com motilidade progressiva em comparação com a
458 DMA. Quando os espermatozoides criopreservado com GLY foram submetidos a curva
459 de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ (25° a 5°C), parece ter favorecido a cinética espermática em relação as
460 amidas. Possivelmente esse fato pode estar relacionado com a provável tempo necessário
461 que a molécula de glicerol precisa para penetrar através da membrana espermática [53].

462 Apesar das amidas DMF e DMA apresentarem estrutura molecular menores que
463 a estrutura do GLY e ser relatado como crioprotetores que possuem facilidade em penetrar
464 através membrana espermática. Pukazhenthil et al. [20] e Oldenhof et al. [6], levantaram
465 um questionamento onde parece não haver uma ligação clara entre a permeabilidade dos
466 crioprotetores e a sobrevivência espermática. Os autores obtiveram boas taxas de
467 sobrevivência quando da utilização dos crioprotetores com maior (DMF) e menor (GLY)
468 capacidade de penetração. No entanto, deve-se levar em consideração que diferentes meios
469 de congelamento apresentam diferentes composições de crioprotetores não penetrantes, que
470 pode ter efeitos diferentes na permeabilidade da água e no limiar de tolerância osmótica.

471 Dentre os crioprotetores utilizados, a MF parece ter uma melhor associação entre
472 cinética, estabilidade na membrana plasmática e alto potencial mitocondrial. Apesar
473 disso, os resultados indicam que o DMF é o crioprotetor mais eficaz para a manutenção
474 da estabilidade da membrana plasmática das células espermáticas em garanhões pós-
475 descongelação, podendo ser usado em diferentes curvas de refrigeração, com bons
476 percentuais de membrana estável.

477

Crioprotetores vs estabilidade da membrana plasmática e alto potencial mitocondrial

479

480 Dentre as estruturas espermáticas, particularmente a membrana plasmática e
481 acrossomal, são as mais importantes e podem serem comprometidas durante a
482 criopreservação diminuindo a capacidade fertilizante dos espermatozoides [54, 55]. Desta
483 forma, a viabilidade espermática mensurada através da estabilidade da membrana
484 plasmática por meio da citometria de fluxo é um importante parâmetro a ser considerado
485 na avaliação seminal do sêmen de garanhões. Os dados encontrados, revelaram que a
486 DMF foi a amida que possibilitou melhor proteção das células de possíveis danos
487 osmóticos sofridos durante a criopreservação, seguido pelo DMA, MF e GLY. Os
488 maiores percentuais de membranas plasmática estável em células espermáticas
489 criopreservadas com DMF pode ser atribuída à menor toxicidade, maior permeabilidade
490 e menor viscosidade deste crioprotetor [56, 57]. A despeito do GLY apresentar maiores
491 valores de velocidade em cinética espermática independente da curva de refrigeração
492 utilizada, o oposto aconteceu com a membrana plasmática, sendo encontrado um maior
493 percentual de membranas instáveis, esse fato provavelmente pode estar relacionado com
494 os danos osmóticos sofridos pelo uso deste e/ou possivelmente pela concentração
495 utilizada (v/v 5%). Parece não haver uma relação direta entre o tamanho molecular, a
496 permeabilidade dos crioprotetores e a criopreservação, uma vez que foram obtidas boas
497 taxas integridade de membrana após a criopreservação com crioprotetores com maior
498 capacidade de penetração e menor tamanho molecular (DMF) [58] e com maior tamanho
499 molecular e menor penetração (GLY) [31]. Neste sentido, Oldenhof et al. [6] observaram
500 que o GLY forneceu ótima proteção das membranas espermáticas e menores danos
501 osmóticos quando utilizados em concentrações ideais (250-500mM), combinado com
502 curvas de congelação rápidas (23°C/min⁻¹ a 53°C/min⁻¹). Similares hipóteses também
503 foram sugeridas por García et al. [39].

504 A menor quantidade de células com membrana plasmática estável pós-
505 descongelação criopreservadas com o GLY, podem ter ocorrido possivelmente devido a
506 algumas hipóteses: a ligação do grupo hidroxila do GLY com o grupo fosfato dos
507 fosfolipídios da membrana espermática, consequentemente podendo haver uma
508 desestabilização tornando-a mais propícia a danos osmóticos [59]; algumas proteínas de
509 superfície podem ser desnaturadas pela presença do GLY, perder a sua função enzimática
510 e provocar mudança irreversível da interação proteína-fosfolipídio [33]. Por sua vez,
511 podem aglomerar formando diferentes estruturas na membrana como a fase hexagonal-II

512 e deixar a células mais suscetível a danos osmóticos [28]; por ser um crioprotetor de alta
513 viscosidade, o GLY pode aumentar a viscosidade intracelular, baixar o ponto de
514 congelação das células e levar a uma maior desidratação e/ou acúmulo de componentes
515 citoplasmáticos e por fim danos osmóticos [33], principalmente quando usado em altas
516 concentrações [6].

517 Entretanto, esses acontecimentos ainda são controversos entre diferentes
518 literaturas. Desta forma, Hammerstedt et al. [27], acreditam que a redução da quantidade
519 de células íntegras, resulta em perda de componentes celulares essenciais durante a fusão
520 o espermatozoide com o oócito. Neste sentido, Hay et al. [60] encontraram declínio da
521 ligação entre espermatozoides e oócitos utilizaram GLY como crioprotetor em sêmen de
522 cães. Assim como, Cook et al. [61] relataram menores taxas de clivagem na ICSI quando
523 o sêmen equino foi criopreservado com GLY. As hipóteses para esses achados, podem
524 estar relacionadas a função das proteínas de superfície dos espermatozoides serem
525 responsáveis pelo reconhecimento e ligação com a zona pelúcida do oócito [62, 63],
526 Assim, quando o GLY provoca a desnaturação essas proteínas, estas perdem suas funções
527 e possivelmente essa seria a explicação para a redução da fertilidade [33]. Contrariamente
528 a esse achados Vidamente [12] encontraram satisfatórias taxas de fertilidade com o uso
529 do GLY na criopreservação do sêmen equino.

530 Contrariamente algumas hipóteses podem ser sugeridas em relação as amidas, que
531 possui menor viscosidade em comparação com o GLY [56], possivelmente o uso dessas
532 como crioprotetor, não acumula grande quantidade de soluto no citoplasma celular, e/ou
533 pode não ter havido uma ação negativa na interação proteína-fosfolipídio, deixando as
534 células com a membrana mais estável e resistente a danos osmóticos. Fato esse, que pode
535 ser justificado pelo maior percentual de membranas plasmática estável encontradas neste
536 estudo, utilizando os crioprotetores DMF, seguido da DMA e por fim MF. Apesar das
537 duas amidas apresentarem menores velocidade neste estudo, a alta proporção de células
538 com membrana estável, significa maior número de espermatozoides com capacidade de
539 participar da ligação com a zona pelúcida do óocito e possibilidade de fertilização.

540 As mitocôndrias são organelas sensíveis a refrigeração [64] e ao estresse osmótico
541 [31, 54, 57]. A capacidade metabólica da funcionalidade mitocondrial para fornecer
542 energia à célula reflete no melhor desempenho e movimento das células espermáticas
543 [52], assim sendo, possivelmente a redução da motilidade está relacionada aos danos
544 causados na mitocôndria dos espermatozoides [65] ou a redução da disponibilidade de
545 ATP e outros componentes para o metabolismo energético. Outro interessante dado

546 encontrado neste estudo, diz respeito ao efeito dos crioprotetores testados e a função das
547 mitocôndrias. Desta forma, o GLY mostrou elevado número de células com alto potencial
548 mitocondrial em comparação com as amidas MF, DMF e DMA, respectivamente. Neste
549 sentido, pode ser hipotetizado que existiu uma relação direta da função mitocondrial e a
550 cinética espermática principalmente em relação a linearidade dos espermatozoides, fato
551 esse observado quando o sêmen foi criopreservado com o GLY. Apesar do GLY interferir
552 negativamente no citoesqueleto dos espermatozoides consequência de danos osmóticos
553 induzidos as células [39, 53], parece não ter havido comprometimento no metabolismo
554 das mitocôndrias, justificado pelos valores de alto potencial mitocondrial encontrados no
555 presente estudo.

556 O potencial da membrana mitocondrial descreve o gradiente de prótons formado
557 pela passagem de elétrons ao longo da cadeia de transporte de elétrons, que são usados
558 pela enzima ATP-sintase responsável pela produção de ATP [21, 66]. Dessa forma, como
559 a motilidade espermática depende do metabolismo energético mitocondrial, danos
560 mitocondriais durante o processo de criopreservação podem ser uma das principais causas
561 de decréscimo da motilidade pós-descongelção [21, 36].

562 Os resultados gerais após observação de parâmetros como a cinética espermática
563 em associação com o alto potencial mitocondrial, leva a hipotetizar que, o baixo
564 percentual da motilidade progressiva, linearidade e maior amplitude lateral de cabeça na
565 criopreservação dos espermatozoides com DMF e DMA, foram encontrados quando as
566 células apresentaram um menor número de células com alto potencial mitocondrial. O
567 inverso foi observado para o GLY que apresentou maiores valores de alto potencial
568 mitocondrial associado com a maiores percentuais de motilidade progressiva, linearidade
569 e menor amplitude lateral de cabeça.

570 A baixa produção de ATP pode comprometer o suporte energético necessário para
571 que as células espermáticas desempenhem um bom movimento. Possivelmente o fato das
572 células apresentarem menores valores de cinética espermática quando foram
573 criopreservadas com MF, DMF e DMA, pode estar relacionado ao bloqueio ou disfunção
574 da ATP-sintase, assim como, pela diminuição do gradiente de prótons possivelmente por
575 interferência em alguns dos seus complexos. Essa hipótese pode ser justificada através dos
576 achados de Cecilia et al. [67], os quais relataram que a DMF em cloroplastos, em altas
577 concentrações atua inibindo a cadeia de transporte de elétrons e atua negativamente em
578 baixas concentrações na ATP-sintase. Justificando assim, os menores valores de cinética
579 dos espermatozoides criopreservado com as amidas assim como menores número de

580 células com alto potencial mitocondrial. Essas hipóteses, entretanto, deve ser melhor
581 estudada *in vitro* e extrapolada também para testes de fertilidade.

582 Todavia, o efeito desses achados, no potencial fertilizante dos espermatozoides
583 seja ele bom ou ruim, ainda necessitam ser elucidados. Os achados do presente estudo
584 estão de acordo com Rodriguez et al. [57], os quais relataram haver diferença significativa
585 em termo de potencial mitocondrial entre DMF e GLY pós-descongelção do sêmen
586 equino. Isso foi também evidenciado por Darr et al. [36], os quais relataram haver uma
587 preservação da atividade mitocondrial pós-descongelção entre a associação do GLY e
588 MF presentes no diluente Botucurio®.

589

590 *Curvas de refrigeração vs avaliações do CASA e citometria de fluxo*

591

592 Apesar de existir uma sugestão das curvas e tempo de refrigeração para cada um
593 dos diluentes mundialmente comercializados [8, 12], a literatura mostra uma grande
594 variação nas curvas de refrigeração positivas [1, 3, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,
595 19, 20, 21, 22], eventualmente existem ganhões cujos espermatozoides possuem
596 diferença na criosobrevivência, isso talvez aconteça devido à baixa resistência da sua
597 membrana plasmática a determinadas temperaturas. Sendo assim, necessitam de uma
598 curva ideal de criopreservação para que se obtenha boa sobrevivência [3]. Desta forma,
599 os resultados através das avaliações realizadas demonstraram que a curva positiva de
600 refrigeração $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, entre 25° e 5°C (duração de 20 min) com taxas de temperatura de
601 refrigeração de forma cronológica e gradativa para esse grupo de ganhões avaliados,
602 independente do crioprotetor utilizado, apresentou melhores percentuais de cinética
603 espermática (motilidade total, motilidade progressiva, amplitude lateral de cabeça e
604 linearidade) em comparação as curvas $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, entre 25° e 5°C (duração de 80 min)
605 e $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, entre 25° e 5°C com tempo de estabilização curto (15 min) e longo (75 min).
606 Possivelmente, quando as células foram criopreservadas na curva $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ os danos
607 osmóticos foram menores, provavelmente pelo tempo necessário para haver a migração
608 da água entre o meio intra e extracelular.

609 A curva de refrigeração $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, mostrou maior percentual de espermatozoides
610 com membrana plasmática estável, bem como, maior número de células com alto
611 potencial mitocondrial. Observa-se ainda que existiu uma relação direta quando se
612 utilizou a curva de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, entre maior percentual de espermatozoides com membrana
613 plasmática estável, maior número de células espermáticas com alto potencial

mitocondrial e melhor cinética espermática. Por outro lado, menor percentual de espermatozoides com membrana estável, menores números de células espermáticas com alto potencial mitocondrial e menores valores de cinética espermática foram observados quando as curvas $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, entre 25° e 5°C , +15 min estabilização 5°C e $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, entre 25° e 5°C , +75 min estabilização 5°C , foram utilizadas. Possivelmente, isso aconteceu devido aos maiores danos causados durante a criopreservação, por exceder o limite de tolerância osmótica das células [26, 31, 44]. Assim sendo, tanto a perda da viabilidade celular pela exposição do crioprotetor como, a sobrevivência celular após a descongelação deve serem levadas em consideração para projetar um protocolo ideal de criopreservação [16], ou até mesmo a composição do diluente de congelamento pode influenciar na curva de refrigeração antes da criopreservação [44].

625

626 *Relação entre crioprotetor e curvas de refrigeração*

627

628 A relação crioprotetor e curvas de refrigeração, demonstraram o GLY apresentou
629 maiores resultados na motilidade progressiva, quando comparado a DMF e DMA, assim
630 como, constatou maiores valores de alto potencial mitocondrial em comparação a todas
631 as amidas (MF, DMF e DMA), em todas as curvas utilizadas (C1, C2, C3 e C4). Os dados
632 mostram que quanto mais alto foi o potencial mitocondrial mais alto foram os valores de
633 velocidade dos espermatozoides, esse acontecimento leva-se a hipotetizar que
634 possivelmente, exista uma ação das amidas impossibilitando que as células espermáticas
635 desempenhem a sua velocidade potencial. Esse episódio não foi observado quando os
636 gametas masculinos foram criopreservados com GLY. Quando a criopreservação foi
637 realizada na curva $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ e $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ (C1 e C2), resultados mais promissores
638 foram observados na motilidade progressiva para a MF, já para o alto potencial
639 mitocondrial a curva $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ (C1) demonstrou valores superiores quando o sêmen foi
640 criopreservado com todos os crioprotetores em comparação com as demais curvas
641 utilizadas. Isso leva-se a pensar, que pode existir uma diferença de crioresistência
642 espermática e alguns crioprotetores necessitam de uma curva de refrigeração ideal para
643 desempenhar a sua função na manutenção da velocidade da cinética espermática. Neste
644 sentido, Vidament [12] demonstrou que curva de $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ trouxe benefícios para um
645 grande número de garantias em comparação a curva de $0,01^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ anteriormente
646 utilizada pelo mesmo autor.

647 A média de espermatozoides com membrana plasmática estável criopreservadas
648 com DMF e DMA na curva $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, foram superiores ao GLY e MF. Possivelmente,
649 as evidências levam a pensar que quando as taxas de refrigeração foram diminuindo de
650 forma gradativa e lenta, favoreceu a transição da membrana dos espermatozoides
651 criopreservados com DMF e DMA. Essa fase é o primeiro ponto crítico que as células
652 espermáticas são submetidas durante a criopreservação e ocorre entre uma faixa de
653 temperatura de 30 a 10°C [17, 25, 26]. Extrapolando os achados desses autores, para os
654 resultados encontrados no presente trabalho, hipotetizamos que nas curvas de refrigeração
655 estudadas as células tiveram diferentes intervalos de tempo durante a fase de transição da
656 membrana entre a temperatura ambiente (25°C) até 10°C , sendo que nas curva de
657 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ (15 ou 75 min de estabilização) as células levaram 15,
658 60 e 3,7 minutos respectivamente durante a fase de transição.

659 Hammerstedt e Hay [68], demonstraram em espermatozoide de bovinos a
660 refrigeração promoveu desnaturação das proteínas, redução da atividade enzimática e
661 danos osmóticos. Por tanto, uma curva de refrigeração de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, onde a fase de
662 transição ocorreu em 15 min, parece ter favorecido a reorganização lipídica da membrana
663 e acarretou menos danos osmóticos aos espermatozoides durante esta fase, resultando em
664 maior número de células com membrana plasmática estável, cinética com mais
665 velocidade e mais alto número de alto potencial mitocondrial nas análises para essa curva.
666 Por outro lado, uma curva na qual a fase de transição ocorreu de forma mais rápida 3,7
667 min para a curva de $4^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ ou mais lenta 60 min para a curva de $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, os
668 resultados foram menores nos parâmetros estabilidade da membrana, menor números de
669 células com alto potencial mitocondrial e velocidade de cinética espermática diminuída.

670

671

672

673

674

675

676

677

678

679

680

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.