CARLA PATRICIA TEODORO DE CARVALHO

*Avaliação do processo de congelação do sêmen equino in natura diluído, 5°C,
-55°C e pós-descongelação*

Pirassununga

2017

CARLA PATRICIA TEODORO DE CARVALHO

**Avaliação do processo de congelação do sêmen equino in natura diluído, 5°C,
-55°C e pós-descongelação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3574
FMVZ

Carvalho, Carla Patrícia Teodoro de
Avaliação do processo de congelação do sêmen equino in natura diluído, 5°C, -55°C e pós-descongelação / Carla Patrícia Teodoro de Carvalho. -- 2017.
85 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, Pirassununga, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Congelamento. 2. Espermatozoide. 3. Equino. 4. Supercooling. I. Título.

São Paulo, 25 de outubro de 2017
CEUA N 9491070417

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Rubens Paes De Arruda
Área: Reprodução Animal
Rubens Paes De Arruda (orientador)

Título da proposta: "AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CONGELAÇÃO DO SÊMEN EQUINO IN NATURA DILUÍDO, 5°C, -55°C E PÓS-DESCONGELAÇÃO".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 10/outubro/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Estamos solicitando a mudança do Título da Dissertação de Mestrado da minha orientada Carla Patricia Teodoro de Carvalho de [Efeitos do supercooling e da nucleação sobre características espermáticas de garanhões] para [Avaliação do processo de congelamento do sêmen equino in natura diluído, 5°C, -55°C e pós-descongelamento]. O motivo da nossa solicitação foi que, ao término do experimento, concluímos que este outro título seria mais adequado. Gostaríamos de informar que a metodologia inicial proposta não sofreu nenhuma mudança. Ou seja, estamos solicitando apenas a mudança do título da Dissertação. Atenciosamente, Prof. Rubens Paes de Arruda".

Comentário da CEUA: "Mudança de título aprovada".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Claudia Madalena Cabrera Mori
Vice-Presidente
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CARVALHO, Carla Patricia Teodoro de. Avaliação do processo de congelação do sêmen equino *in natura* diluído, 5°C, -55°C e pós-descongelação

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho, com amor,
aos meus pais, Osman e Zeníra, e
aos meus irmãos, Carlana e Cláudio,
que mesmo longe, sempre estiveram presentes. Obrigada,
pelo carinho, amor, força e por
sempre me apoiarem em tudo, indiscutivelmente. Sem vocês, nada
disso, seria possível!!*

*Dedico também, a você, Nina,
minha querida companheira de
quatro patas em boa parte da
minha vida! Obrigada, por ter
me ensinado tanto, sobre tudo.
Você foi incrível durante estes 22
anos.*

Serei eternamente grata...

À Deus, por me dar saúde e equilíbrio, por me dar forças todos os dias, por permitir pessoas tão especiais em minha vida.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, muito obrigada, o Senhor é um exemplo, pra mim, de superação, de amigo, de profissional, de educador, de determinação, de força, de vontade. Sempre serei grata, pela paciência com que conduziu e me direcionou na escrita da dissertação, por lidar com a minha ansiedade e sensibilidade de forma delicada. Ao longo desses quase três anos, foram muitas ideias, trabalho e principalmente de muito conhecimento.

À minha irmã, Carlana, que sempre foi e continua sendo minha maior incentivadora. Obrigada, pelo apoio e por sempre querer que eu trilhasse os melhores caminhos.

Aos meus pais, Osman e Zenira, pelo imenso apoio, por nunca me deixarem na mão e sempre abraçarem os meus sonhos, junto comigo.

Ao Dago, que foi tão presente nessa fase final. Obrigada pelo apoio, companhia, atenção, carinho, cumplicidade e principalmente pela paciência nesses momentos de tanta ansiedade.

As minhas tias, Olga Helena, Lucinda, Hortalina e Maria, pelo carinho, convivência e amizade.

Ao meu primo, Thainer, irmão de coração. Muito obrigada pela convivência, carinho, amizade.

Aos meus grandes amigos, Gleice, Jairo, Dani, Will e Lillian. Muito obrigada por estarem sempre presentes, mesmo distantes. Obrigada pelas longas conversas, conselhos, amizade, carinho. Tenham certeza que vocês possuem local cativo em meu coração, saudades de todos.

Ao Ariosto, que sempre me apoio, acreditou em mim, foi um grande parceiro. Serei eternamente grata.

À Gabi, muito obrigada, pela amizade, parceria, pelas discussões técnicas, por sempre me ouvir, em momentos de “desespero”, por sempre dizer que: Tudo dará certo!!

À Milena, muito obrigada, pela amizade, atenção, cumplicidade, parceria, conversas, risadas!!

Aos amigos pós-graduandos, Gabriela, Nataly, Renata, Gabriel e Danilo, que foram essenciais para realização do experimento. Se disponibilizaram, em acordar cedo, incluindo vários fins de semana, sempre com muito comprometimento e bom humor. Obrigada pessoal, vocês foram mil.

Aos amigos e pós-graduandos, Vinícius, Shirley, Sâmara, Gerardo, Vitiño, Batí, Arroz, Muito obrigada pela amizade, respeito e pelos momentos de descontração.

Aos pós-graduandos, Angela, Bia, Tiago, Mari, Igor, Gabriela, Cecília, muito obrigada, pelo convívio diário e convívio diário.

A Profa. Dra. Roberta de Vieira de Moraes Bronzoni, pelos ensinamentos, desde o início da minha carreira acadêmica e pela orientação durante as minhas Iniciações Científicas na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

Ao Prof. Dr. Rodolfo de Araújo Beber, que aceitou ser meu orientador no Trabalho de Conclusão de Curso, que intermediou a minha vinda para realização do estágio obrigatório com o Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda. Muito obrigada, pela confiança depositada, mesmo tendo convivido muito pouco comigo. Serei eternamente grata!!

A Prof. Dra. Eneíva Carla Carvalho Celeghini, por ser sempre solícita, pela amizade, pelas orientações, paciência e pelas infinitas dúvidas tiradas durante este período.

Ao Prof. Dr. Guilherme Pugliesi, pela ajuda essencial com a análise estatística, pela amizade, sempre muito prestativo e atencioso.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, principalmente aqueles localizados no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) em Pirassununga/SP, Profa. Dra. Eneíva Carla Carvalho Celeghini, Prof. Dr. Ed Hoffman Madureira, Prof. Dr. Mário Binelli, Profa. Dra. Annelise de Souza Traldi e Prof. Dr. Guilherme Pugliesi, agradeço pelas aulas, ensinamentos e convívio diário.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal, Clayton, João Carlos, Márcio, Ricardo e José Maria, por ajudarem sempre que solicitados.

A TK Equipamentos por ajustar a curva de Congelação, o que foi fundamental para a realização deste trabalho.

*Aos **garanhões**, muito obrigada. Sem vocês, não seria possível a realização do experimento.*

Aos meus animais de estimação, Tobias, Miucha, Kiko, Panqueca e Pepa, os quais transmitem-me, uma paz imensa, sem contar o imenso carinho proporcionado.

*A todos os **estagiários** que passaram por aqui ao longo destes dois anos.*

À CAPES pela concessão da bolsa.

À todos que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

“O sucesso é uma consequência e não um objetivo.”

Gustave Flaubert

RESUMO

CARVALHO, C. P. T. **Avaliação do processo de congelação do sêmen equino *in natura* diluído, 5°C, -55°C e pós-descongelação.** [Evaluation of the freezing process of extender equine semen, 5°C, -55°C and thawing]. 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Durante o processo de criopreservação o espermatozoide passa por diversas mudanças físico-químicas, podendo ocasionar variados graus de lesões as células espermáticas. Determinar o momento do processo de congelação pelo qual o espermatozoide está mais suscetível às injúrias seria importante passo para progresso do processo de congelação e, com isso, a fertilização. O objetivo foi avaliar o efeito do processo de congelação na integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial (PIAIA) integridade das membranas plasmática (MPI), acrossomal (AI), potencial mitocondrial (APM) e citoesqueleto de espermatozoides equinos *in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C. Além de, estudar as etapas de refrigeração, congelação e dentro da congelação, a etapa de *supercooling*. Assim como, verificar o efeito de duas curvas de congelação (-15°C/min e -33°C/min) durante o *supercooling* 5°C à -55°C, para isto, foram utilizadas duas máquinas de congelação modelo TK 3000. Para desenvolvimento do experimento, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL com concentrações de 100×10^6 espermatozoides/palheta e submetidos a uma curva 1 (rápida; -0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização, -33°C/min de 5°C até -80°C e, -10°C/min de -80°C para -120°C) e a outra para uma curva 2 (lenta; -0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização, -15°C/min de 5°C até -80°C e, -10°C/min de -80°C até -120°C). Para realização do experimento foram utilizados 4 garanhões com 6 repetições. Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados com auxílio do *software Statistical Analysis System for Windows SAS®*, versão 9.3 (SAS, 2005). Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as duas curvas de congelação usadas. No entanto, houve efeito de tempo ($P < 0,05$) para todas as características estudadas. Quando foi analisado progressivamente a criopreservação *in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C, foi observado que as lesões progrediram com a congelação. Entretanto, quando estudado, as etapas do processo de congelação, a refrigeração *in natura* diluído até 5°C, *supercooling* dentro da congelação de 5°C até -55°C e congelação -55°C até -196°C, assim, o citoesqueleto sofreu maior despolimerização durante a refrigeração, entretanto, a membrana acrossomal, sofreu danos reduzidos durante esta etapa. Para MPI e APM ocorreu maior

porcentagem de redução da integridade no momento final da congelação -55°C até -196°C, assim, como PIAIA influenciada pela redução de MPI e APM, sofrerem mais injúrias, nessa etapa. De uma forma geral, o processo de congelação causa danos irreversíveis ao espermatozoide equino. Sendo que, a refrigeração causou maior despolimerização do citoesqueleto, porém, praticamente não afetou o acrossomo. A redução de células com MPI, APM e PIAIA, ocorre no momento final da congelação -55°C e -196°C. O acrossomo é a membrana que menos lesa com o processo de congelação. Também, observamos similaridade entre as curvas de congelação rápida (-33°C/min) e lenta (-15°C/min), para os parâmetros estudados. Assim, este estudo permitiu avaliar progressivamente a resposta biológica do espermatozoide durante a criopreservação, obtendo uma compreensão dinâmica e quantitativa, dos momentos mais críticos para o espermatozoide, para as características avaliadas e técnicas utilizadas.

Palavras-chave: Congelação. Espermatozoide. Equino. *Supercooling*

ABSTRACT

CARVALHO, C. P. T. **Evaluation of the freezing process of extender equine semen, 5°C, -55°C and thawing. [Avaliação do processo de congelação do sêmen equino in natura diluído, 5°C, -55°C e pós-descongelação].** 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

During the cryopreservation process the sperm cells undergo several physico-chemical changes, which can cause varying degrees of injury to the sperm cells. Determining the timing of the freezing process by which sperm is most susceptible to injury would be an important step in progressing the freezing process and thus fertilization. The objective was to evaluate the effect of the freezing process on the integrity of plasma membranes, acrosomal and mitochondrial potential (PIAIA) plasma membranes integrity (MPI), acrosomal (AI), mitochondrial potential (APM) and equine spermatozoa diluted in natura, 5°C, -55°C and -196°C. In addition to, study the steps of refrigeration, freezing and within freezing, the stage of supercooling. The freezing curves -15°C/min and -33°C/min during *supercooling* 5°C to -55°C were used to verify the effect of two freezing machines model TK 3000. For the development of the experiment, the semen was packed in 0.5mL straw with concentrations of 100×10^6 spermatozoa/straws and submitted to a curve 1 (fast; -0.25°C/min from 22°C to 5°C, with a period of 20 minutes for stabilization, -33°C/min from 5°C to -80°C and -10°C/min from -80°C to -120°C) and the other for a curve 2 (with a period of 20 minutes for stabilization, -15°C/min from -5°C to -80°C and -10°C/min from -80°C to -120°C). For the experiment, 4 stallions with 6 replicates were used. The data obtained from the experimental procedures were analyzed with the aid of Statistical Analysis System for Windows SAS®, version 9.3 (SAS, 2005). There was no significant statistical difference ($P > 0.05$) between the two freezing curves used. However, there was a time effect ($P < 0.05$) for all the characteristics studied. When cryopreservation was progressively analyzed (semen extender, 5°C, -55°C and -196°C), it was observed that the lesions progressed with freezing. However, when studied, the steps of the freezing process, refrigeration (in natura diluted to 5°C), *supercooling* within freezing 5°C to -55°C and freezing -55°C to -196°C, thus, the cytoskeleton underwent greater depolymerization during refrigeration; however, the acrosomal membrane was almost not damaged during this stage. For MPI and APM, a higher percentage of integrity reduction occurred at the final freezing point -55°C to -196°C, thus, as PIAIA, probably due to MPI and APM, suffered more injuries at this stage. In general, the

freezing process causes irreversible damage to the equine sperm. Since, the refrigeration caused greater depolymerization of the cytoskeleton, however, it practically did not affect the acrosome. The reduction of cells with MPI, APM and PIAIA, occurs at the final moment of freezing -55°C and -196°C . The acrosome is the membrane that suffers damages from freezing process. Also, similarities were observed between the freezing ($-33^{\circ}\text{C}/\text{min}$) and slow ($-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$) freezing curves for the studied parameters. Thus, this study allowed to progressively evaluate the spermatozoid biological response during cryopreservation, obtaining a dynamic and quantitative understanding of the most critical moments for the spermatozoon, for the evaluated parameters and techniques used.

Keywords: Freezing. Sperm. Equine. *Supercooling*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Apresentação esquemática das mudanças de fase da membrana durante a transição de fase da refrigeração e iniciando a congelação.....	33
Figura 2 -	Esquema experimental simplificado dos procedimentos realizados durante este experimento.....	47
Figura 3 -	Figura 3: Etapas de avaliações dentro do processo de congelação. Etapa de refrigeração ($\pm 22^{\circ}\text{C}$ até 5°C) com uma curva de refrigeração de ($-0,25^{\circ}\text{C min}$), dentro da etapa de congelação, <i>supercooling</i> de 5°C até -55°C , com curvas de congelação de (-15°C/min e -33°C/min) e congelação de -55°C até -120°C com curva de (-10°C/min) e imersão em nitrogênio líquido (-196°C)	48
Figura 4 -	Dois padrões principais de fluorescência de actina de espermatozoides equinos corados com FITC-Faloidina: 1) Na região pós-acrossomal e, 2) fluorescência brilhante na região do colo. (A) Controle, com distribuição homogênea da intensidade de brilho; (B) Intensidade de brilho intensificada na região pós-acrossomal e região mais brilhante no colo.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de espermatozoides com despolimerização do citoesqueleto de actina avaliados em diferentes etapas do processo de congelação.....	58
Tabela 2 -	Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de espermatozoides com integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial (PIAIA) avaliados em diferentes etapas do processo de congelação.....	61
Tabela 3 -	Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana plasmática (MPI) avaliadas em diferentes etapas do processo de congelação.....	63
Tabela 4 -	Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de espermatozoides com integridade acrossomal (AI) avaliados em diferentes etapas do processo de congelação.....	64
Tabela 5 -	Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de células com potencial mitocondrial (APM) nas diferentes etapas do processo de congelação.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de espermatozoide com despolimerização do citoesqueleto de actina, nas seguintes etapas do processo de congelação: <i>in natura</i> diluído até 5°C; 5°C até -55°C e de -55°C até -196°C.....	59
Gráfico 2 - Médias ($\pm$ erros padrão) da redução da porcentagem de células com integridade de membrana plasmática, acrossomo e potencial mitocondrial (PIAIA), nas seguintes etapas do processo de congelação: <i>in natura</i> diluído até 5°C; 5°C até -55°C e de -55°C até 196°C.....	62
Gráfico 3 - Médias ($\pm$ erros padrão) da redução da porcentagem de células com integridade da membrana plasmática (MPI) avaliados nas seguintes etapas do processo de congelação: <i>in natura</i> diluído até 5°C; 5°C até -55°C e de -55°C até -196°C.....	63
Gráfico 4 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de redução de células com integridade acrossomal (AI) avaliados nas seguintes etapas do processo de congelação: <i>in natura</i> diluído até 5°C; 5°C até -55°C e de -55°C até -196°C.....	65
Gráfico 5 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de células com potencial mitocondrial (APM) nas seguintes etapas do processo de congelação: <i>in natura</i> diluído até 5°C; 5°C até -55°C e de -55°C até -196°C.....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das células de acordo sua integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial, detectados pelas sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC – 1.....	53
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ALH	Amplitude Lateral de Cabeça
ANOVA	Análise de variância
APM	Alto Potencial de Membrana Mitocondrial
BSA	Albumina Sérica Bovina
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
g	Grama
H33342	Hoechst 33342
Hz	Hertz
IA	Inseminação Artificial
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6' – Tetracloro – 1,1',3,3' - Tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
kg	Quilograma
L	Litro
M	Molar
min	Minutos
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
M	Molar
n	Número de unidades experimentais
nm	Nanômetro
NRC	National Reseach Council
P	Probabilidade
PBS	Tampão Fosfato Salino
pH	Concentração de Íons de Hidrogênio

PI	Iodeto de Propídio
PIAIA	Membrana Plasmática Intacto, Acrossomo Intacto e Alto Potencial de Membrana Mitocondrial
PIAIB	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Intacto e Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial
PIALA	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Alto Potencial de Membrana Mitocondrial
PIALB	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial
PLAIA	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Alto Potencial de Membrana Mitocondrial
PLALA	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Alto Potencial de Membrana Mitocondrial
PLAIB	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial
PLALB	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SAS	<i>Statistical Analysis System</i> (Sistema de Análise Estatística)
SPTZ	Espermatozoide
TALP	Meio de Tyrode com Albumina, Lactato e Piruvato
TBS	Tampão Salino Tris

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
/	Por
x	Vezes
10 ⁶	Milhões
<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou Igual
≤	Menor ou Igual
±	Mais ou menos
-	Menos Negativo
=	Igual
®	Marca Registrada
:	Para (1:100)
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	24
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	27
2.1	Criobiologia espermática.....	28
2.2	Refrigeração do sêmen equino dentro do processo de congela- ção.....	29
2.3	Criopreservação do sêmen dentro do processo de congelação.....	31
2.3.1	<i>Supercooling</i> dentro do processo de congelação.....	36
2.3.2	Formação de cristais de gelo intracelular.....	38
2.4	Descongelação.....	39
3	HIPÓTESES.....	42
4	OBJETIVOS.....	44
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
5.1	Animais.....	49
5.2	Colheita de sêmen.....	49
5.3	Avaliação do sêmen <i>in natura</i> diluído.....	49
5.3.1	Volume.....	50
5.3.2	Motilidade e vigor.....	50
5.3.2	Concentração espermática.....	50
5.4	Diluição, envase e criopreservação espermática.....	50
5.5	Análises espermáticas.....	51
5.5.1	Avaliação do citoesqueleto (despolimerização dos filamentos de actina).....	52
5.5.2	Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial.....	53
6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
7	RESULTADOS.....	57
7.1	Avaliação da despolimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto dos espermatozoides durante o processo de congelação.....	58
7.2	Integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocon- drial dos espermatozoides durante o processo de congelação.....	60

7.3	Integridade da membrana plasmática dos espermatozoides durante o processo de congelção.....	62
7.4	Avaliação da integridade do acrossomo dos espermatozoides durante o processo de congelção.....	64
7.5	Avaliação do potencial mitocondrial dos espermatozoides durante o processo de congelção.....	65
8	DISCUSSÃO.....	67
9	CONCLUSÕES.....	75
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
	ANEXO A.....	85

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O aumento do uso de biotecnologia na reprodução animal e o desenvolvimento de técnicas que beneficiam o processo de congelação e armazenamento de sêmen têm proporcionado melhor aproveitamento de garanhões de alto potencial genético.

O sêmen congelado possui numerosos benefícios, dentre eles incluem facilidade de transporte, maior acesso a sêmen de garanhões de genética superior, prevenção de transmissão de doenças venéreas, melhoramento genético, utilização de sêmen de animais mortos, não há necessidade da ida da égua até o garanhão, colheita de sêmen fora da estação de monta para armazenamento e utilização de animais que estão em competição.

Com as associações de criadores de equinos tornando-se cada vez mais abertas para inserção de biotecnologias e sendo um dos objetivos o melhoramento genético permitindo o registro de potros produzidos a partir do sêmen congelado, surge a necessidade de avanços na técnica de congelação do sêmen equino para aumentar a fertilidade. Para isto, é necessário melhor compreensão e identificação dos momentos pelos quais os espermatozoides estão mais suscetíveis a danos durante o processo de congelação, ainda que, exista diferença de fertilidade entre garanhões quando utilizado sêmen criopreservado (SQUIRES et al., 2003; MOORE et al., 2006).

Assim, a utilização de espermatozoides criopreservados de garanhões tem impulsionado a inseminação artificial. No entanto, ainda apresenta reduzida fertilidade em relação ao sêmen refrigerado e ao *in natura* diluído (MOORE et al., 2006), com taxas de gestação variando entre 35 a 90% quando comparado ao sêmen refrigerado e *in natura* diluído (MORRIS e ALLEN, 2002). Isto demonstra a necessidade de novos estudos com o objetivo da redução dessa variabilidade.

Muitos fatores devem ser considerados quando tem o propósito de congelar sêmen de um garanhão, já que o processo de congelação pode ser afetado por diferentes elementos, entre eles, higienização inadequada do pênis do garanhão, tipos de curvas de refrigeração e congelação, concentração espermática e volume da palheta, diluidor, crioprotetor, entre outros. Esses agentes que irão influenciar na viabilidade espermática, podendo ter reflexo direto na fertilidade.

Na congelação o espermatozoide passa por diversas mudanças físico-químicas, podendo ocasionar danos irreversíveis à integridade estrutural da célula espermática (GRAHAM,

1996; AURICH, 2008), na organização lipídica da membrana, podendo acontecer perda de proteínas, da motilidade dos espermatozoides, integridade do acrossomo (WATSON, 1995; NARESH, 2016) e citoesqueleto (PEÑA et al., 2011), levando redução da qualidade do sêmen e capacidade de fertilização (GRAHAM, 1996; AURICH, 2008).

Tentar determinar o momento mais crítico dentro do processo de congelação seria o princípio para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes. Protocolos mais efetivos proporcionariam otimização da criopreservação de espermatozoides equinos. Pensando nisso, se avaliarmos o processo de congelação durante a refrigeração ($\pm 22^{\circ}\text{C}$ até $4-6^{\circ}\text{C}$), e dentro do processo inicial de congelação elas passam pelo *supercooling* (0°C até -55°C), congelação (-55°C até -80°C) e descongelação. Assim, em etapas separadas, poderíamos indicar os pontos e alterações mais deletérias a célula espermática, de forma que modificações possam ser realizadas para amenizar os danos.

Neste contexto, este experimento teve como objetivo avaliar o efeito do processo de congelação na integridade das membranas plasmática, acrossomal, potencial mitocondrial e citoesqueleto de espermatozoides equinos *in natura* diluído, 5°C , -55°C e -196°C . Além disso, busca-se verificar o efeito de duas curvas de congelação ($-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-33^{\circ}\text{C}/\text{min}$) durante o *supercooling* (5°C à -55°C).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Considerando que durante o processo de congelação normalmente ocorrem alterações, as quais, comprometem a funcionalidade do espermatozoide. Para isso, com o objetivo de melhor entendimento do efeito deste processo sobre a célula espermática, faz-se necessário entendimento de cada etapa da criopreservação. Dessa forma, alguns tópicos serão revisados a seguir.

2.1. Criobiologia espermática

De acordo com Barth e Oko (1989) o espermatozoide pode ser dividido em diferentes regiões: cabeça, colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal.

O espermatozoide é uma célula especializada capaz de armazenar e transportar material genético que têm como principal função fertilizar o óocito, para isto, é necessário que seja preservada sua integridade estrutural e funcional (AURICH, 2005).

O processo de congelação do sêmen é dividido em fases distintas: iniciando na coleta, diluição, envase, refrigeração, armazenamento, congelação e descongelação. A forma como cada uma destas fases é conduzida vai ter reflexo direto na estrutura e funcionalidade espermática (AMAN e PICKET, 1987; CELEGHINI, 2005).

O metabolismo espermático é reduzido com a diminuição da temperatura e interrompido com a congelação. Sendo este, reduzido pela metade a cada queda de 10°C. Portanto, quando os espermatozoides são refrigerados da temperatura corporal ($\pm 38^{\circ}\text{C}$ até 5°C), seu metabolismo é reduzido para cerca de 10% do nível original (HAMMERSTEDT et al., 1990; MEDEIROS et al., 2002). Para interromper os processos metabólicos, as células precisam ser congeladas abaixo de -13°C , momento em que as reações químicas conduzidas termicamente não progridam (MEDEIROS et al., 2002).

2.2 Refrigeração do sêmen dentro do processo de congelação

A refrigeração do sêmen pode ser realizada de forma passiva ou ativa (KAYSER et al., 1992). A vantagem do uso do sistema passivo como os dispositivos de transporte *Equitainer*[®] (Hamilton -Thorn Research, Danvers, MA, 1994) e a caixa de Isopor (Botu-Flex[®], Botupharma Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil), (Max-Sêmen Express[®], Rancho das Américas, Porto Feliz, SP, Brasil) é o seu custo moderado, porém, apresentam a desvantagem quanto sua inconsistência da curva de refrigeração, imediatamente quando utiliza-se um sistema ativo como as máquinas de congelação de sêmen, obtém-se uma taxa de refrigeração consistente e, tecnicamente correta (KAYSER et al., 1992).

Para entender como a redução de temperatura ocasiona danos aos espermatozoides, é necessário conhecer sua estrutura. Resumidamente, a célula espermática é constituída por um núcleo altamente condensado e microtubular, fibroso e estruturas membranosas. Embora as estruturas microtubulares e fibrosas sejam importantes para a motilidade dos espermatozoides, estruturas membranosas são mais importantes quando se trata de processo de congelação. Entre as estruturas membranosas incluem as membranas plasmática, acrossomal interna e externa, nuclear e membranas internas das mitocôndrias. O núcleo é altamente condensado e provavelmente contém pouca água. Assim, a maior parte da água dentro de um espermatozoide está, possivelmente, localizada nos espaços entre as membranas adjacentes, tal como entre a membrana plasmática e acrossomal externa, ou no interior de estruturas, tais como o acrosomo e mitocôndrias (AMAN e PICKET, 1987).

As membranas espermáticas são formadas por bicamadas de fosfolipídios, cujas cadeias de ácidos graxos são predominantemente poli-insaturada, com cabeça hidrofílica e cadeias de acil-hidrofóbicas. Em condições normais, as membranas estão em fase fluída e são impermeáveis para solutos como dissacarídeos. Assim, quando submetidas à redução da temperatura, assumem uma forma cônica, na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Essa estrutura é denominada micela invertida. Com o processo de refrigeração pode resultar na diminuição da fluidez e, para muitos lipídios a forma de micela invertida (parte hidrofóbica extracelular e parte hidrofílica intracelular) é uma condição transitória, no entanto, para algumas situações se torna permanente. Como efeito, tem-se aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e

pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana, causando danos irreparáveis e perda de viabilidade (WATSON, 2000; MAZIERO, 2009; SIEME et al., 2015).

Para Aman e Picket (1987) e Sieme et al. (2015) muitos fatores podem afetar a fluidez ou a flexibilidade das membranas, sendo a temperatura um fator importante, porém, não o único, que o processo de refrigeração altera a estrutura ou conformação de biomoléculas, tais como, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, que podem ser irreversíveis e prejudicar sua função.

Inicialmente o sêmen pode ser refrigerado rapidamente ($-0.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$) desde a temperatura corpórea até a temperatura ambiente ($\pm 37^{\circ}\text{C}$ para $\pm 19^{\circ}\text{C}$), o que parece não ocasionar danos aos espermatozoides quando este se encontra diluído em meio adequado (MORAN et al., 1992; KAYSER et al., 1992). No entanto, se durante o processo de refrigeração o espermatozoide for exposto a uma rápida mudança de temperatura, pode ocorrer o choque frio entre 19°C a 8°C , o qual pode ser evidenciado pela presença de muitos espermatozoides com movimentos circulares, a perda prematura de mobilidade, diminuição da produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana e perda de moléculas intracelulares (AMAN e PICKETT, 1987; MORAN et al., 1992; KATILA, 1997).

Contrariando resultados descritos por Moran et al. (1992), Watson (1995) e Katila (1997), Quinn et al. (1980), anteriormente haviam observado que as transições de fase da membrana são notadas durante a refrigeração do sêmen da temperatura fisiológica até 0°C , sendo a fase crítica de entre 15°C e 0°C . A ocorrência de choque frio pode ser prevenida controlando a taxa de refrigeração e adicionando compostos protetores aos diluentes de sêmen (MEDEIROS et al., 2002).

Ao longo de décadas muitos estudos foram desenvolvidos com o objetivo de encontrar a forma que gerasse menos danos a célula espermática durante o processo de refrigeração. Pensando nisso, Douglas-Hamilton et al. (1984) para desenvolverem o dispositivo de transporte de sêmen *Equitainer*[®] compararam o efeito de refrigeração lenta ($<0,33^{\circ}\text{C}/\text{min}$) com refrigeração rápida ($>1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), onde observaram que a motilidade foi diminuída ($P<0,01$) e houve aumento dos defeitos morfológicos ($P<0,01$) quando utilizada de refrigeração rápida.

Assim como, Douglas-Hamilton et al. (1984), Varner e colaboradores (1989) obtiveram melhores resultados para parâmetros de motilidade em armazenamento do sêmen a 4°C com refrigeração lenta do sêmen ($-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$), fornecendo parâmetros de motilidade superiores quando comparadas a curva moderada ($-0,9^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e rápida ($-1,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$), o que sugerem efeitos prejudiciais de curvas de refrigeração rápidas. Assim, o efeito da refrigeração se difere entre as espécies, como foi observado em espermatozoides de javali por Wolders e colaboradores

(2005), sendo este sensível ao choque frio entre 15°C a 5°C, o qual pode ser reduzido realizando-se a refrigeração de forma lenta e gradual (aproximadamente 1°C/min), segundo a citação dos autores para a espécie.

Com relação ao período de refrigeração e posteriormente congelação, Crockett et al. (2000) ao congelarem amostras após período de 2, 6 e 12 horas pós refrigeração obtiveram valores de 27% de motilidade progressiva e quando congelados 24 horas após a refrigeração caiu para 10% ($P < 0,05$).

Com objetivo de avaliar membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial, RAPHAEL (2007) trabalhou com dois grupos distintos, sendo um utilizando sêmen centrifugado antes de ser submetido a refrigeração e o outro não, as análises foram realizadas nos momentos 0 e 24, 48 e 72, onde foi encontrado que ao longo do tempo as membranas plasmática e acrossomal são lesadas, assim como ocorre redução do potencial mitocondrial, tanto para os espermatozoides submetidos a centrifugação ou não, porém quando centrifugado houve resultados superiores para os parâmetros abordados.

JANUSKAUSKAS et al. (1999) não encontraram diferença estatística para integridade de membranas plasmática e acrossomal utilizando duas diferentes curvas de refrigeração para espermatozoides de touros refrigerados da temperatura ambiente até 4°C, utilizando uma curva controle (4,2°C/min) e a outra (0,1°C/min). As palhetas foram mantidas a 4°C por um período de tempo de equilíbrio de quatro horas e posteriormente congeladas, no entanto, não foi encontrada diferença para integridade das membranas, no entanto, quando utilizada a curva de refrigeração de (0,1°C/min) obteve 0,4% de fertilidade maior.

2.3 Criopreservação do sêmen dentro do processo de congelação

As baixas taxas de fertilidade observadas após o processo de congelação estão relacionadas, principalmente, aos danos causados ao funcionamento celular. Danos que envolvem redução de temperatura, refrigeração, choque frio, desidratação celular, formação de cristais de gelo intracelularmente, aquecimento (liberação de calor latente durante o *supercooling*) por meio de uma zona intermédia de temperaturas, cerca de -15 a -60°C. Sendo, o êxito final do processo de congelação limitado pelo processo de descongelação (AMAN e PICKET, 1987). Porém, para Woelders (1997) acredita que essa zona crítica do processo de congelação ocorre

em dois momentos: 1) o período de *supercooling* (0°C a -5°C) e 2) formação de cristais de gelo (-6°C a -15°C).

No entanto, Watson (2000) e Maziero (2010) descreveram que a faixa crítica de temperatura para os espermatozoides está em torno de -3°C e -10°C, neste momento ocorre a formação de cristais de gelo e liberação do calor latente de fusão, o qual acarreta um aumento de temperatura do sistema e as maiores injúrias celulares. Sendo assim, a velocidade de congelação neste período deve ser o mais rápido possível.

Os espermatozoides não são adaptados para suportar baixas temperaturas. De tal modo, a criopreservação dessas células causa redução de viabilidade celular e função normal. O dano celular possui diferentes graus de gravidade e é induzido por mecanismos distintos em cada uma das fases do processo, sendo o estado funcional das células congeladas e descongeladas o resultado das lesões acumuladas ao longo do processo de congelação e, ao término, podendo resultar em sua sobrevivência, morte celular ou apresentar um comprometimento funcional (HOLT, 2000; MEDEIROS et al., 2002).

As células espermáticas necessitam de um ou mais agentes para resistirem ao processo de congelação. Estes agentes crioprotetores são divididos em duas classes: crioprotetores penetrantes e não penetrantes. Apesar de o processo de criopreservação exigir mais do que o uso de crioprotetores para que a técnica seja bem sucedida, os crioprotetores adicionados ao diluente congelante protegem as células. Posto isto, a preservação das células espermáticas depois do processo de congelação é obtida devido a interação diluidor, crioprotetor, curvas de refrigeração, congelação e descongelação, na tentativa de reduzir os danos provocados durante este procedimento (AMAN e PICKET, 1987; CELEGHINI, 2005).

A criopreservação envolve a exposição dos espermatozoides a temperaturas fisiologicamente baixas, induzindo mudanças na organização lipídica durante a exposição do espermatozoide congelado, dando início a uma série de alterações de natureza biofísica nos espermatozoides (HAMMESTED et al., 1990; HOLT, 2000).

Algumas destas mudanças na localização de fosfolipídios e proteínas ocorrem acima de 0°C, mas por causa da variedade das membranas dos espermatozoides e da gama de temperaturas em que deslocamentos de fase ocorrem, muitas mudanças iniciadas durante a refrigeração são contínuas durante a congelação (AMAN e PICKET, 1987). Desta forma, quando uma suspensão de espermatozoides é congelada abaixo de 5°C, inicialmente forma em torno dos espermatozoides uma fina camada de gelo e, as células, permanecem descongeladas, devido os pontos de congelação do crioprotetor e do meio extracelular serem diferentes (MAZUR, 1984).

Em um ponto entre -5°C e -15°C , dependendo da velocidade de congelação e crioprotetor utilizado, os cristais de gelo começam a formarem. Aparentemente, a membrana plasmática atua como uma barreira para impedir o crescimento de cristais de gelo a partir do meio para dentro da célula. Como a água congela extracelularmente, sais eliminados dos cristais de gelo se acumulam e aumentam suas concentrações na água descongelada restantes, provocando aumento do gradiente osmótico através da membrana plasmática, ocorre o efluxo de água dos espermatozoides e congela externamente (AMAN e PICKET, 1987; HAMMESTED e GRAHAM 1990; PARKS e GRAHAM, 1992; HOLT, 2000).

Após a formação de gelo extracelularmente, a concentração de soluto na fração extracelular não congelada aumenta, levando à desidratação celular devido ao transporte de água com o gradiente osmótico. Como consequência, tem-se aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana, causando danos irreparáveis e perda de viabilidade (WATSON, 2000; MAZIERO, 2010; SIEME et al., 2015), como ilustrado na figura 1 (SIEME et al., 2015).

Fonte: Adaptado de SIEME et al., (2015)

Figura 1: Apresentação esquemática das mudanças de fase da membrana durante a transição de fase da refrigeração e iniciando a congelamento.

Pugliesi e colaboradores (2014), compararam duas técnicas para congelamento de sêmen, a convencional, onde as palhetas foram mantidas em uma grade horizontal 4cm do vapor de nitrogênio e queda de $(-70^{\circ}\text{C}/\text{min})$ onde foram mantidas por 20 minutos e a técnica onde um

dispositivo cilíndrico foi colocado em botijão criogênico com a borda tocava o nitrogênio líquido. As palhetas foram mantidas numa posição vertical com a borda inferior a 5 cm acima da superfície durante 10 minutos, com uma queda de ($-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Os autores concluíram que a técnica convencional provavelmente reduziu os efeitos deletérios do soluto elevado no meio, mas pode não ter diminuído o efeito de recristalização que ocorre entre ($-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e -130°C). Para a técnica de congelação rápida, os autores sugerem que neste momento ocorreu a cristalização, também ao efeito de *seeding*, o que pode resultar em redução de lesões celulares.

Utilizando criomicroscopia, Woelders et al. (2005) observaram que os danos espermáticos aumentaram na faixa de 0°C a -15°C . A congelação de forma lenta pareceu ter um efeito negativo a -5°C , pois o nível de dano foi maior quando o sêmen foi congelado para -5°C com uma curva de ($-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) do que quando utilizada uma curva de ($-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$), sugerindo que os espermatozoides se tornam cada vez mais instáveis em temperaturas inferiores a 0°C e que o sêmen deve ser congelados até a temperatura de nucleação a uma taxa relativamente alta ($-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e a nucleação do gelo deve ser induzida tão rapidamente quanto possível.

Maziero (2010), observou que as curvas mais rápidas ($-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$), intermediárias ($-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e mais lentas (-8 a $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) acarretam valores similares de qualidade seminal pós-descongelação. Com relação ao protocolo de congelação utilizado neste experimento, os parâmetros espermáticos nos sistemas automatizados, que possibilitam um melhor controle da taxa de congelação, apresentaram similaridade com os resultados obtidos no método convencional na caixa de isopor.

Avaliando a porcentagem de células móveis, características de motilidade, integridade das membranas plasmática e acrossomal em espermatozoides de javali, utilizando diferentes sistemas automatizados de congelação, mostrou-se que os espermatozoides congelados usando curva máxima de ($-6^{\circ}\text{C}/\text{min}$) exibiram viabilidade pós-descongelação reduzida ($14,2 \pm 2,8\%$ de espermatozoides intactos na membrana plasmática média) quando comparados aos congelados pela curva de ($-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$) ($18,4 \pm 3,2$ e $25,7 \pm 3,7\%$ de espermatozoides intactos da membrana plasmática média, respectivamente). Os autores atribuíram esta melhoria na resposta pós-descongelação ao fato de a curva de congelação rápida expor a célula espermática a um menor tempo na fase de liberação do calor latente durante a formação dos cristais de gelo, período que é extremamente prejudicial à célula espermática (THURSTON et. al., 2003).

Em outro estudo semelhante a Thurston et al. (2003), Medrano et al. (2009) utilizaram curvas (variando de $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-24^{\circ}\text{C}/\text{min}$) de (5°C até -5°C) e, entre (-5°C e -80°C) curvas de congelação (de $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-80^{\circ}\text{C}/\text{min}$), houve diferença individuais entre javalis de (-5°C

até pós-descongelção) para motilidade e integridade de membrana plasmática e a integridade acrossomal não variou entre animais e curvas. No entanto, entre (-5°C e -80°C), a motilidade e a integridade de membrana plasmática foi melhor utilizando curvas de congelção entre (-30°C/min e -80°C/min), e não ocorreu diferença entre curvas para integridade acrossomal. Os autores concluíram que a curva de congelção afetou a sobrevivência espermática de diferentes maneiras, isto é, os espermatozoides de alguns indivíduos eram menos suscetíveis do que os outros. Para alguns indivíduos, a sobrevivência foi baixa, independentemente da curva de congelção, mas para outros, foi melhor com curvas mais rápidas. Isso confirma que os efeitos da curva de congelção na sobrevivência do espermatozoide, depende das diferenças de javali interindividuais mais do que no próprio processo de congelção.

Com relação, a congelção de espermatozoides de touro, carneiro e suínos recomenda-se curva de congelção variando de (-30°C/min a -50°C/min), a qual proporcionou maior integridade das membranas plasmática e acrossomal pós-descongelção (KUMAR et al., 2003).

Curvas de congelção mais rápidas (>-60°C/min) podem resultar em recristalização pós-descongelção com formação de grandes cristais de gelo, o que pode causar danos às células físicas (GRAHAM, 1996). Tentando encontrar a curva de congelção ideal para sêmen equino visando reduzir a formação de gelo intracelular, Devireddy et al. (2002) verificaram que a curva de congelção considerada ótima era aproximadamente (-29°C/min), isto na ausência de crioprotetor (utilizando apenas o diluente Kenney), já na presença do crioprotetor Lactose – EDTA notaram que a curva de (-60°C/min) era a melhor.

Melo (2005) comparou dois protocolos de congelção de sêmen (convencional x pós-refrigeração). Na convencional, as palhetas foram mantidas em estabilização a 5°C por 20 minutos em refrigerador comercial *Minitüb*⁹, seguida da estabilização, em vapor de nitrogênio por 20 minutos à 6cm e o outro método foi utilizando o *equitainer*[®] para refrigeração, e congelção após 24 horas de refrigeração. Não foram encontradas interferência entre os dois métodos nos parâmetros avaliados: motilidade total e progressiva, bem como, integridade de membrana plasmática.

Neild et al. (2003) avaliou as membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial de espermatozoides equinos em diferentes estágios do processo de congelção (*in natura*; após diluição e centrifugação; após diluição para congelar e ficar em equilíbrio à temperatura ambiente; 5°C; após *supercooling* até -15 °C e depois de descongelar), a criopreservação significativamente (P <0,05) afetou as membranas espermáticas, mesmo antes de centrifugar,

onde em cada etapa aumentou a morte espermática, resultando em média de 10% de sobrevivência ao término do processo.

Na tentativa de determinar a curva de congelação ideal para espermatozoides de garanhões quando criopreservados com glicerol, etilenoglicol ou dimetil formamida, Moore et al. (2006) relataram que obtiveram melhor número de espermatozoides totais e progressivamente móveis quando criopreservados com glicerol. Ainda, foi observado que as amostras congeladas (-10°C/min) apresentaram maiores porcentagens de células viáveis do que as amostras congeladas (-50°C/min) quando utilizadas taxas de congelação variando de (-5°C/min a -50°C/min).

2.3.1 *Supercooling dentro do processo de congelação*

Muitos estudos tratam da importância do *supercooling* em células espermáticas durante o processo de congelação como um dos principais causadores de danos ao espermatozoide durante a criopreservação. Algumas das terminologias encontradas na literatura para descrever este evento, *supercooling* (super-refrigeração) ou *undercooling* (sub-refrigeração) ou *subcooling* (sub-refrigeração), este tem sido considerado um importante fator na formação de gelo intracelular. *Supercooling* é o momento em que o sistema passa por uma redução de temperatura abaixo do ponto de fusão antes do processo inicial de nucleação do gelo extracelularmente, causando uma redução de temperatura muito abrupta (DILLER, 1975; OZKAVUKCU e ERDEMLI, 2003; WOELDERS et al., 2005; MORRIS e ACTON, 2013).

Supercooling é uma situação que ocorre frequentemente na atmosfera, isto porque as soluções aquosas têm uma forte tendência para congelar abaixo do seu ponto de fusão antes da nucleação do gelo ocorrer. Logo após a nucleação, têm-se início crescimento de cristais de gelo, com o retorno da temperatura ao seu ponto de fusão, ocorre a liberação de calor. Alguns fatores podem estar relacionados com a ocorrência do *supercooling*, dentre eles, temperatura, curva de congelação, volume e pureza de partículas encontradas na palheta (OZKAVUKCU e ERDEMLI, 2003).

O *supercooling* foi relatado em espermatozoides de peru (ZAVOS e GRAHAM, 1983), garanhão (KAYSER et al., 1992), camundongos (MAZUR e KOSHIMOTO, 2002), embriões, células somáticas e tecidos humanos (DILLER, 1975; OZKAVUKCU e ERDEMLI, 2002; BENSON et al., 2012), células de cordão umbilical humanas (PRICKETT et al., 2015), embriões bovinos (MORRIS e ACTON, 2013), logo depois da nucleação ocorre o retorno da

temperatura ao ponto de equilíbrio devido a liberação de calor latente resultante do processo de fusão (OZKAVUKCU e ERDEMLI, 2002).

Tendo em vista, o conceito de *supercooling*, Diller (1975) utilizou a criomicroscopia para controle da formação de gelo intracelular em eritrócitos humanos, sabendo-se que em um processo de congelação normal, a temperatura do sistema retorna para a temperatura de mudança de fase equilíbrio após a nucleação devido à liberação do calor latente de fusão. Diller (1975) utilizou um sistema que eliminava o efeito de rebote, diminuindo a dissipação de energia. Em três grupos, o *supercooling* foi induzido nos eritrócitos quando atingia as seguintes temperaturas: 0°C, -5°C e -12°C, sendo assim, a nucleação ocorreu a -11°C, -800°C e -845°C respectivamente, concluindo que quando o *supercooling* em pequenos valores haverá pouco efeito sobre a taxa de congelação de transição. No entanto, como a extensão do *supercooling* torna-se grande, a influência sobre a taxa de congelação é grande. Assim, um aumento na taxa de congelação ou no grau de formação de gelo extracelular aumentará a probabilidade de formação de gelo intracelular em eritrócitos humanos.

Zavos e Graham (1983) em estudo realizado com o objetivo de avaliar os efeitos do *supercooling* e temperaturas de nucleação sobre a fertilidade de espermatozoides de peru criopreservados, onde foram realizados quatro tratamentos: 1) sêmen foi mantido a 5°C; 2) a nucleação espontânea na temperatura de -12°C, posteriormente congelado para -20°C e mantidos assim, por quatro horas 3) a nucleação espontânea na temperatura de -4°C, posteriormente congelado para -20°C e mantidos assim, por quatro horas 4) congelado até -196°C. O momento da nucleação foi determinado por análise térmica diferencial (DTA). Foi observado que no tratamento 3 formou cristais de gelo maiores intracelularmente, no entanto no tratamento 2, os cristais de gelo eram finos e pontiagudos, o que favorece lesão de membranas. Posto isto, a fertilidade do tratamento 3 ($P < 0,05$) foi maior em relação ao tratamento 2. Conclui-se que quando o a nucleação ocorre em temperaturas mais baixas, mas tempo a célula ficou exposta ao *supercooling* e pior grau de sobrevivência das células espermáticas.

Mazur e Koshimoto (2002) compararam taxas de desidratação e o grau *supercooling* com a probabilidade de formação de gelo intracelular. Onde os espermatozoides foram congelados rapidamente para temperaturas (-20, -30, -40 e -70°C) com curvas de congelação variando de (-20°C/min a -130°C/min) apresentaram motilidade elevada. No entanto, a sobrevivência é <10% quando congelados a (260°C/min ou 530°C/min), presumivelmente porque, essas curvas rápidas proporcionaram com que a água intracelular não saísse rapidamente o suficiente para

evitar o *supercooling in situ*, o qual conduz a nucleação e congelamento e formação de gelo intracelularmente.

Em espermatozoides de javali a curva de congelação passa através de uma faixa de temperatura crítica, definida como o intervalo quando ocorre a formação de cristais de gelo e conseqüente desidratação celular está ocorrendo. Durante esta faixa (aproximadamente -5°C a -50°C), a curva de congelação irá determinar se as células permanecem em equilíbrio com o seu ambiente extracelular iniciam progressivamente o *supercooling* com a possibilidade crescente de formação de gelo intracelular (KUMAR et al., 2003).

2.3.2 Formação de cristais de gelo intracelular

Os cristais de gelo são formados quando uma solução é congelada abaixo de 0°C , os quais começam a se formarem extracelularmente. A formação de cristais de gelo deixa o meio extracelular hipertônico e aumentando a pressão osmótica. Desta forma, ocorre a desidratação celular, a qual é necessária para evitar a formação de gelo intracelular. Sendo que, a taxa de congelação um determinante neste momento para formação ou não de gelo intracelular. Se a taxa de congelação é muito lenta, ocorre alta concentração de sais intracelulares, devido à desidratação excessiva da célula, pode lesar o espermatozoide. Se a taxa de congelação é muito rápida, pode ocorrer a formação de cristais de gelo intracelulares (AMANN e PICKETT, 1987; PARKS e GRAHAM, 1992; WATSON, 2000; PEÑA, et al., 2012).

O estresse induzido pela formação de cristais de gelo está associado principalmente com as mudanças na pressão osmótica da porção não congelada que a acompanha (WATSON, 2000).

A curva de congelação deve ser lenta o suficiente para permitir que tenha saída de água da célula para não formar gelo intracelular e que seja rápida para que essa célula espermática não fique exposta por um longo período em uma solução hipertônica (PARKS e GRAHAM, 1992; WATSON, 2000). Contudo, Watson (2000) obteve as melhores taxas de sobrevivência espermática utilizando curvas rápidas entre ($-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$) quando comparadas com curvas lentas de ($-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$).

Posto isto, (MAZUR, 1984) descreve que as células exibem uma curva de congelação específica ideal, onde o dano causado pela desidratação osmótica (lesão causada por solutos e a formação de gelo intracelular é mínimo e a sobrevivência celular após a descongelação é

máxima). Um dos principais fatores que determinam a taxa de congelação ideal é a permeabilidade da membrana a água, que depende da composição da membrana e do estado da fase, bem como a presença de agentes crioprotetores (DEVIREDDY et al., 2002).

A formação de cristais de gelo compromete todas as estruturas espermáticas. Watson (1995) encontrou grandes cristais de gelo em mitocôndrias de espermatozoides submetidos a criopreservação. Assim como, Counters et al. (1989) encontraram mudanças estruturais nas mitocôndrias.

Geralmente os danos espermáticos resultantes do processo de congelação são atribuídos a formação de gelo intracelular. Entretanto, Morris et al. (2007) observaram que os mecanismos de lesão a célula espermática devem-se ao balanço osmótico que ocorre durante o processo de descongelação. Pela técnica de calorimetria - *Differential Scanning Calorimetry* (DSC), estes autores concluíram que os danos provocados a morfologia da célula espermática equina devem-se apenas ao choque osmótico no momento da descongelação. Anteriormente, Morris et al. (2006) haviam encontrado este resultado para espermatozoides humano. Portanto, a principal fonte de danos quase certamente vêm do estresse osmótico, especialmente durante a descongelação (PEÑA et al., 2012).

Morris et al. (2007) verificaram que existe uma ampla faixa de congelação para espermatozoides equino. Valores que variam entre $(-0,3^{\circ}\text{C}/\text{min})$ a $(-3000^{\circ}\text{C}/\text{min})$ na presença de crioprotetor (glicerol) não apresentaram formação de gelo intracelular, confirmados pela técnica de crioscopia (*Cryo Scanning Electron Microscopy* - *Cryo SEM*). Estudos em espermatozoides de camundongos demonstraram que a congelação intracelular só ocorre se as células são submetidas a curvas de congelação de $(-2000^{\circ}\text{C}/\text{min})$ (MAZUR e KOSHIMOTO, 2002).

2.4 Descongelação

A descongelação do sêmen promove o retorno do fluxo de água para dentro da célula podendo causar a ruptura da membrana celular. Uma vez que taxas de congelação excessivamente rápidas causam a formação de gelo intracelular, pensa-se que a taxa de congelação ideal precisa ser lenta o suficiente para evitar esse efeito letal, mas suficientemente rápido para minimizar os efeitos prejudiciais de exposição prolongada a altas concentrações de sal ("efeitos de solução"), isto é, todas as mudanças características da solução extracelular quando gelo cristalizar (aumento da concentração de sal, o aumento da pressão osmótica, mudando o pH, a

composição da solução alterado até cristalizar), podendo ficar muito tempo exposta a soluções hipertônicas e consequentemente ocorrer morte celular. Nesta situação, o gelo pode progredir para dentro da célula, se a integridade da membrana for afetada (MAZUR, 1984; WATSON, 1995; HOLT, 2000).

Acredita-se que a porcentagem de sobrevivência celular aos protocolos de criopreservação seja determinado pela sensibilidade ao estresse osmótico durante a adição e remoção do crioprotetor e durante a congelação e descongelação (WATSON, 2000). Portanto, para que um protocolo de congelação seja bem-sucedido é necessário que a velocidade de congelação mantenha ao máximo integridade celular pós-descongelação. No entanto, os crioprotetores aumentam o volume da solução descongelada, reduzindo desta forma, a concentração de sal presente na solução, consequentemente ocorrerá menos desidratação. Contudo, os crioprotetores são menos permeáveis às membranas celulares do que a água e, devido a isto, são adicionados em concentrações molares, eles induzem grandes gradientes osmóticos transitórios através das membranas plasmáticas celulares quando são adicionados às células antes da congelação e quando removidas das células após a descongelação, o que pode danificar ou causar lesões as células (GUTHRIE et al., 2002; GILMORE et al., 1995, MOORE et al., 2006).

Amann e Pickett (1987), descreveram para que o espermatozoide seja capaz de fertilizar o oócito, ele precisa ter pelo menos quatro características básicas após o congelação e descongelação: 1) Metabolismo para a produção de energia; 2) Motilidade progressiva; 3) Enzimas acrossomais, que são essenciais para a penetração do espermatozoide através das estruturas que circundam o oócito; 4) Proteínas da membrana plasmática, que são importantes para a sobrevivência do espermatozoide dentro do trato reprodutivo feminino e para a ligação do mesmo com a membrana do oócito durante a fertilização.

A recristalização é um fenômeno que ocorre durante a descongelação, ocorrendo uma reorganização de microcristais de gelo intracelularmente, onde os cristais maiores causariam danos. Evidências que suportam este mecanismo foram observados devido à redução da sobrevivência de células causada pela descongelação lenta de células que sofreram congelação rápida. A descongelação rápida dessas células que foram congeladas rapidamente permite a descongelação desses cristais antes que ocorra a recristalização, enquanto que o reaquecimento lento permite reorganização dos cristais, resultando em lesão e morte celular (MAZUR, 1984; CELEGHINI, 2005).

Durante a descongelação, os espermatozoides são expostos a um ambiente hipotônico que resulta em um aumento de volume celular devido ao influxo de água no citoplasma. O dano

celular ocorre principalmente devido ao este estresse hiperosmótico durante a congelação resultando em desidratação celular e ao estresse hipoosmótico durante a descongelação que causa o inchaço celular (PEÑA et al., 2012).

Parks e Graham (1992) sugeriram que durante a refrigeração, congelação e descongelação as membranas passam por reordenação dos lipídios, as quais, perturbam as associações: lipídios com lipídios e lipídicas com proteínas necessárias para seu funcionamento.

Sendo assim, para avaliar o efeito das curvas de congelação na viabilidade do sêmen, em dois diferentes métodos de congelação convencional (com queda de $-70^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e rápida (queda de $-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$), onde as palhetas de ambos os grupos foram descongeladas por dois protocolos de descongelação: (1) 37°C durante 30s (lento); ou (2) 75°C durante 7s (rápido). Observando-se que a motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática do sêmen criopreservado utilizando técnicas convencionais ou de congelação rápida não foi afetada pela descongelação lento ou rápido (PUGLIESI et al., 2014).

3. HIPÓTESES

3. HIPÓTESES

- ✓ Existem diferenças na integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e citoesqueleto de espermatozoides de garanhões submetidos ao processo de congelação quando avaliados nos momentos: *in natura* diluído ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), 5°C , -55°C e -196°C .
- ✓ Diferentes curvas de congelação durante o *supercooling* provocaram alterações distintas nas membranas plasmática e acrossomal, no potencial mitocondrial e no citoesqueleto de espermatozoides de garanhões.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

Com base nas hipóteses formuladas, o experimento foi delineado com os seguintes objetivos:

- ✓ Avaliar os efeitos do processo de congelação sobre as membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e citoesqueleto dos espermatozoides de garanhões avaliados nos seguintes momentos: *in natura* diluído ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), 5°C , -55°C e -196°C .
- ✓ Verificar os efeitos do *supercooling* sobre as membranas plasmática e acrossomal, no potencial mitocondrial e no citoesqueleto do espermatozoides de garanhões, utilizando-se curvas de congelação lenta (-15°C) e rápida (-33°C).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado de acordo exposto resumidamente no esquema experimental abaixo (Figura 2 e 3).

Figura 2 - Esquema experimental simplificado dos procedimentos realizados durante este experimento.

Figura 3: Etapas de avaliações dentro do processo de congelamento. Etapa de refrigeração ($\pm 22^{\circ}\text{C}$ até 5°C) com uma curva de refrigeração de ($-0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$), dentro da etapa de congelamento, *supercooling* de 5°C até -55°C , com curvas de congelamento de ($-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-33^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e congelamento de -55°C até -120°C com curva de ($-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e imersão em nitrogênio líquido (-196°C).

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA), pertencente ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizada no *Campus* Administrativo Fernando Costa, em Pirassununga, SP.

5.1. Animais

No experimento foram utilizados quatro garanhões e foram colhidos seis ejaculados de cada animal. Os animais pertenciam ao Setor de Equideocultura da Prefeitura do *Campus* Administrativo Fernando da Costa da Universidade de São Paulo – Pirassununga (SP).

Os garanhões foram mantidos sob as mesmas condições de manejo durante o experimento, sendo alojados em baias, soltos em piquetes apropriados individuais regularmente, sendo alimentados com feno e concentrado de acordo com as indicações do [*Nutrient Research Council* (NRC; 2007)]. Ainda, o fornecimento de água e sal mineral *ad libidum*.

5.2. Colheita de sêmen

Previamente as colheitas do sêmen, foi realizada a higienização do pênis do garanhão com algodão umedecido em água em torno de 35°C.

As colheitas de sêmen foram realizadas com vagina artificial modelo Botucatu® (Botupharma Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil), com temperatura interna de 42 a 45°C. Para auxiliar na colheita foi utilizado um manequim estático ou uma égua ovariectomizada devidamente contida (Estro induzido com 20mg de E.C.P.® Cipionato de Estradiol por via intramuscular a cada 10 dias).

5.3. Avaliação do sêmen *in natura* diluído

Logo após a colheita, cada ejaculado foi filtrado e as características seminais foram avaliadas imediatamente *in natura diluído* quanto ao volume (mL), motilidade (%) e vigor (1-5), concentração ($10^6/\text{mL}$). Todo o material que foi utilizado na colheita e na avaliação do sêmen foi mantido a 37°C.

5.3.1. Volume

O volume (mL) foi mensurado imediatamente após a colheita pela leitura direta em uma proveta graduada.

5.3.2. Motilidade e vigor

Para motilidade espermática subjetiva os ejaculados foram diluídos (1:1) em diluidor a base de leite desnatado (BotuSêmen®, Botu-Pharma, Botucatu, Brasil), utilizando-se aumentos de 100 e 400x em microscopia de contraste de fase. A motilidade espermática consistiu na porcentagem estimada de espermatozoides móveis e o vigor, refere-se à velocidade progressiva uniforme das células em movimento e foram classificados em escores de 1 a 5, sendo o escore 1 o mais lento e aumentando gradativamente até o escore 5, correspondendo ao mais rápido movimento progressivo uniforme.

5.3.3. Concentração espermática

A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer, após a diluição de 1:100.

5.4. Diluição, envase e criopreservação espermática

Para criopreservação do sêmen, como apresentado resumidamente na figura 2, foi realizado diluição de 1:1 (sêmen:diluidor) em meio à base de leite desnatado (Botu-Sêmen®-Botupharma Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil) em temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), posteriormente distribuído em tubos de 15mL e centrifugados a 500xg durante 12 minutos. Após a centrifugação, o *pellet* obtido foi suspenso com diluidor para congelamento (Botu-Crio®-Botupharma Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil) em temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), resultando na concentração de 100×10^6 espermatozoides/palhetas.

Posteriormente a homogeneização, o sêmen foi envasado em palhetas 0,5mL (IMV Internacional, St. Paul, Minnesota, USA) e fechadas com esferas estéreis.

Após o envase do sêmen, as palhetas foram submetidas a duas diferentes curvas de congelamento previamente programadas em duas máquinas TK 3000® (TK 3000®, TK Tecnologia em Congelamento Ltda, Uberaba, Minas Gerais, Brasil). Para refrigeração as máquinas foram ajustadas com curvas idênticas, caindo $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$. de 22°C até 5°C e posteriormente mantidas em estabilização durante 20 minutos. No entanto, para congelamento, as máquinas foram ajustadas com curvas diferentes, ou seja, curva 1: rápida $-33^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e curva 2: lenta $-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$), como descrito abaixo.

- ✓ Curva 1: $-0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 22°C até 5°C , com período de 20 minutos para estabilização - **$-33^{\circ}\text{C}/\text{min}$** de 5°C até -80°C e, $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de -80°C até -120°C , posteriormente as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C .
- ✓ Curva 2: $-0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 22°C até 5°C , com período de 20 minutos para estabilização, - **$-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$** de 5°C até -80°C e, $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de -80°C até -120°C , posteriormente as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C .

5.5. Análises espermáticas

Foram realizadas análises em diferentes momentos do processo de congelamento envolvendo duas máquinas, duas diferentes curvas de congelamento e uma concentração. Para isto, as palhetas foram retiradas das máquinas com sistema de congelamento vertical, quando

atingiram as temperaturas desejadas. Portanto, as avaliações espermáticas foram realizadas no sêmen nos seguintes momentos:

- *in natura* diluído ($\pm 22^{\circ}\text{C}$),
- 5°C ,
- -55°C e
- -196°C .

Duas palhetas de sêmen de cada tratamento de uma mesma partida foram descongeladas e avaliadas quanto as características de integridade de membranas plasmática, acrossomal, potencial mitocondrial e citoesqueleto espermático.

As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C durante 30 segundos, sendo o sêmen transferido para tubos de 1,5mL e mantidos aquecidos em banho-maria seco a 37°C até o momento da realização das análises.

5.5.1. Avaliação do citoesqueleto (despolimerização dos filamentos de actina)

Para visualização dos filamentos de actina foi utilizado protocolo modificado a partir do método de Brener et al., (2003), utilizando-se sonda fluorescente Faloidina conjugada com Isotiocianato de Fluoresceína (FITC, 0,2 mM). As palhetas foram descongeladas e diluídas em 150 μL de Solução Salina Tamponada com Tris (TBS, 10x), pH 7,4 e realizado o esfregaço em lâminas de microscópio previamente tratadas com poli-L-lisina. A fixação foi feita com formaldeído em 5% por 10 minutos e lavadas com Tampão Fosfato Salino (PBS), em seguida permeabilizadas em acetona refrigerada durante 10 minutos e deixadas secar ao ar durante 10 minutos, após secas foram reidratadas em TBS contendo 1% de BSA por um período de 10 minutos.

Após 10 minutos em local protegido da luz, as lâminas foram coradas com 5 μL de faloidina conjugada com FITC à 2 Mm e colocada sobre a lâmina, lamínulas de (tamanho 1/2; 20x20mm) e deixadas incubar durante uma hora em temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Após a incubação as lâminas foram avaliadas.

As lâminas foram analisadas com base nos padrões de intensidade de brilho localizado na região pós-acrossomal (BRENER et al., 2003; PEÑA et al., 2012). Foram contadas 200 células por lâmina, utilizando microscopia de epifluorescência em um aumento de 1000x.

5.5.2 Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial

Na avaliação da integridade da membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial foi utilizado 150µL de sêmen diluído em meio TALP *sperm* (1:3), na concentração de 25×10^6 spz/mL, em tubo de microcentrífuga e adicionados 3µL de iodeto de propídeo (PI 0,5mg/mL), 2µL de *Hoescht* 33342 (0,5 mg/mL), 6µL de 5,5', 6,6' - *tetrachloro*-1,1, 3,3' - *tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide* (JC-1 153µM) e 80µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA 100µg/mL). Em seguida, a amostra foi incubada durante 8 min a 37°C no escuro, técnica adaptada de Celeghini et al., (2010).

A leitura foi realizada com uma gota úmida de 4µL entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C. Foram realizadas leituras em aumento de 1000x utilizando-se microscopia de epifluorescência (Nikon, Modelo Eclipse Ni-U 80i, Tóquio, Japão) utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380nm e emissão 435-485nm), B-2E/C (excitação 465-495nm e emissão 515-555nm) e G-2E/C (excitação 540-525nm e emissão 605-655nm). Ao final foram contadas 200 células e classificadas em oito categorias segundo os padrões de fluorescência emitidos.

Quadro 1: Classificação das células de acordo sua integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial, detectados pelas sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC – 1.

ORDEM	CATEGORIA	SIGLAS
1	Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial.	PIAIA
2	Membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial.	PIAIB
3	Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial.	PIALA
4	Membrana plasmática intacta, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial.	PIALB
5	Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial.	PLAIA
6	Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial.	PLALA
7	Membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial.	PLAIB
8	Membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial.	PLALB

Fonte: Nascimento, 2006.

A partir das 8 categorias, foram consideradas as seguintes variáveis: porcentagem de células íntegras, ou seja, com membrana plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA); porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (MPI); porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial (APM) e porcentagem de células com membrana acrossomal intacta (AI).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos após os procedimentos experimentais foram analisados com auxílio do *software Statistical Analysis System for Windows SAS®*, versão 9.3 (SAS, 2005). Inicialmente, a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) foi verificada, e as variáveis que não atenderem as premissas estatísticas seguiram distribuição normal foram transformadas para log [Log (X+1)] ou ranqueadas. Os dados originais ou transformados, foram submetidos à análise de variância através de modelo misto (PROC MIXED, SAS) considerando medidas repetidas no tempo através do comando REPEATED. Para composição do modelo estatístico foram considerados os efeitos principais de tratamento (curva), tempo, animal e suas possíveis interações. Como efeito aleatório foi considerado o ejaculado. Uma segunda análise foi realizada para explorar as mudanças relativas ocorridas em cada momento (tempo) do processamento do sêmen conforme as etapas experimentais. Assim, a proporção (%) de mudança (redução ou aumento) de cada variável foi calculada em cada etapa (Etapa 1: in natura diluído até 5°C; Etapa 2: 5°C até -55°C; Etapa 3: -55°C até -196°C). Para isso, os dados foram submetidos à análise de variância através de modelo misto (PROC MIXED, SAS), considerando os efeitos principais de tratamento (curva), etapa, animal, e suas possíveis interações. Como efeito aleatório foi considerado o ejaculado. Comparações envolvendo mais de uma média foram realizadas pelo teste de Tukey. Foi considerada diferença significativa entre as variáveis testadas quando $P < 0,05$.

7. RESULTADOS

7. RESULTADOS

Nos tópicos a seguir encontram-se descritos os resultados obtidos das avaliações progressivas do processo de congelação (*in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C) e nas etapas de refrigeração (*in natura* diluído até 5°C) do *supercooling* que provavelmente ocorre entre 0°C e -55°C. No entanto, só conseguimos avaliar o efeito do *supercooling* e da descongelação na etapa compreendida entre (5°C até -55°C) e do processo final da congelação (-55°C até -196°C), o qual terá sofrido o efeito da congelação e descongelação.

7.1. Avaliação da despolimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto dos espermatozoides durante o processo de congelação

Sobre a despolimerização dos filamentos de actina do citoesqueleto, notou-se que em todos os momentos avaliados (*in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C), houve diferença significativa ($P < 0,05$) durante o processo de congelação (Tabela 1). A despolimerização do citoesqueleto de actina aumentou progressivamente no decorrer do processo de congelação, sendo que, em -196°C foi o momento mais afetado. Por outro lado, em relação as curvas de congelação (curva 1, - 33°C/min de 5°C até -80°C e curva 2 -15°C/min de 5°C até - 80°C), que correspondem ao momento por onde o meio passa pelo *supercooling*, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$).

Tabela 1 - Médias ($\pm$ erros padrão) da percentagem de espermatozoides com despolimerização do citoesqueleto de actina avaliados em diferentes etapas do processo de congelação.

Etapas de avaliação	CITOESQUELETO (%)	
	*Curva 1	**Curva 2
<i>In natura</i> diluído	17,1 $\pm$ 0,9 ^d	17,1 $\pm$ 0,9 ^d
5°C	22,7 $\pm$ 1,2 ^c	24,5 $\pm$ 1,5 ^c
-55°C	26,8 $\pm$ 1,3 ^b	28,8 $\pm$ 1,6 ^b
-196°C	31,3 $\pm$ 1,4 ^a	32,1 $\pm$ 1,4 ^a

Valores seguidos por letras diferentes (^{a, b, c, d}) sobrescritos na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$).

*-0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização - **33°C/min** de 5°C até -80°C e, -10°C/min de -80°C até -120°C.

** - 0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização, -**15°C/min** de 5°C até - 80°C e, -10°C/min de -80°C até - 120°C.

Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas curvas de congelamento estudadas em nenhum momento em relação as características estudadas (citoesqueleto, membranas plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial), onde as mesmas foram determinadas para estudar o *Supercooling* durante o processo de congelamento. Portanto, os gráficos 1, 2 e 3 mostram as médias em porcentagem e seus respectivos erros padrão dos resultados obtidos entre as etapas *in natura* diluído até 5°C e as etapas de congelamento: 5°C até -55°C e -55°C até -196°C. Neste sentido, observamos no gráfico 1 que houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) na porcentagem de espermatozoides com despolimerização dos filamentos de actina entre as etapas *in natura* diluído até 5°C e as etapas 5°C até -55°C e -55°C até -196°C. No entanto, entre as etapas 5°C até -55°C e -55°C até -196°C não houve diferença ($P > 0,05$). Assim, como podemos observar no gráfico 1, o processo de refrigeração foi o responsável por causar maior porcentagem de despolimerização do citoesqueleto.

Letras diferentes (a, b) sobre barras indicam diferenças estatística.

Gráfico 1 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de espermatozoide com despolimerização do citoesqueleto de actina nas seguintes etapas do processo de congelamento: (*in natura* diluído até 5°C; 5°C até -55°C e de -55°C até -196°C).

Na avaliação da despolimerização do citoesqueleto de actina foi utilizado a sonda fluorescente FITC-faloidina, a qual permitiu a classificação das células espermáticas, de acordo com a fluorescência emitida, como mostrado na Figura 4.

Figura 4: Dois padrões principais de fluorescência de actina de espermatozoides equinos corados com FITC-Falloidina: 1) Na região pós-acrossomal e, 2) fluorescência brilhante na região do colo. (A) Controle, com distribuição homogênea da intensidade de brilho; (B) Intensidade de brilho intensificada na região pós-acrossomal e região mais brilhante no colo.

7.2. Integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial dos espermatozoides durante o processo de congelamento

Verificou-se que durante o processo de congelamento ocorreu redução da integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (PIAIA) de forma progressiva ($P < 0,05$) entre as etapas analisadas (*in natura* diluído, 5°C , -55°C e -196°C), como apresentado na tabela 2. O momento onde constatou-se maior redução da PIAIA foi no tempo de avaliação -196°C . No entanto, não se evidenciou diferença entre as curvas de congelamento, como já citado acima.

No momento que provavelmente ocorre o *supercooling* de 5°C até -55°C , a curva 1 ($-33^{\circ}\text{C}/\text{min}$) mostrou-se mais eficiente na preservação de espermatozoides em relação a curva 2 ($-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$), no entanto, de -55°C até -196°C , ocorreu uma redução de PIAIA de 43,6% na curva 1 ($-33^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e 22,4% na curva 2 ($-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$), tabela 2. No entanto, foram obtidas apenas diferenças numéricas ($P > 0,05$).

Tabela 2 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de espermatozoides com integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial (PIAIA) avaliados em diferentes etapas do processo de congelamento.

Etapas de avaliação	PIAIA (%)	
	*Curva 1	**Curva 2
<i>In natura</i> diluído	64,5 $\pm$ 1,4 ^a	64,5 $\pm$ 1,4 ^a
5°C	52,9 $\pm$ 2,3 ^b	52,1 $\pm$ 2,4 ^b
-55°C	45,1 $\pm$ 2,7 ^c	36,1 $\pm$ 2,0 ^c
-196°C	25,4 $\pm$ 2,1 ^d	28,0 $\pm$ 2,3 ^d

Valores seguidos por letras diferentes (^{a, b, c, d}) sobrescritos na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$).

*-0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização - **33°C/min** de 5°C até -80°C e, -10°C/min de -80°C até -120°C.

** - 0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização, **-15°C/min** de 5°C até - 80°C e, -10°C/min de -80°C até - 120°C.

No que se refere as avaliações realizadas em diferentes etapas da congelamento, foi notado aumento numérico da porcentagem de espermatozoides com lesões das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial. No entanto, a etapa -55°C até -196°C apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação as etapas *in natura* diluído até 5°C e 5°C até -55°C, como apresentado no Gráfico 2. Não houve diferença estatística significativa entre as etapas *in natura* diluído até 5°C e 5°C até -55°C.

Letras diferentes (a, b) sobre barras indicam diferenças estatística

Gráfico 2 - Médias ($\pm$ erros padrão) da redução da porcentagem de células com integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial (PIAIA), nas seguintes etapas do processo de congelamento: (*in natura* diluído até 5°C; 5°C até -55°C e de -55°C até 196°C).

7.3. Integridade da membrana plasmática dos espermatozoides durante o processo de congelção

Os valores médios para integridade da membrana plasmática (MPI) estão expressos na Tabela 3. Houve diferença estatística entre as etapas de congelção (*in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C) ($P < 0,05$). A integridade da membrana plasmática não se diferiu entre as duas curvas de congelção. Entretanto, é possível notar uma diferença numérica no momento onde ocorre o *supercooling*, sendo que, a curva 1 (-33°C/min) mostrou-se mais eficiente na preservação da integridade da MPI. Porém, na curva 1 (-33°C/min) da etapa (-55°C até -196°C), ocorreu uma redução de 42,6% de MPI, enquanto que na curva 2 (-15°C/min) ocorreu perda de 21,2%, mostrando ser mais eficiente principalmente neste momento.

Tabela 3 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana plasmática (MPI) avaliadas em diferentes etapas do processo de congelção.

Etapas de avaliação	MPI (%)	
	*Curva 1	**Curva 2
<i>In natura</i> diluído	66,0 $\pm$ 1,5 ^a	66,0 $\pm$ 1,5 ^a
5°C	56,2 $\pm$ 2,3 ^b	54,4 $\pm$ 2,4 ^b
-55°C	47,1 $\pm$ 2,7 ^c	38,1 $\pm$ 2,3 ^c
-196°C	27,0 $\pm$ 2,3 ^d	30,0 $\pm$ 2,4 ^d

Valores seguidos por letras diferentes (^{a, b, c, d}) sobrescritos na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$).

*-0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização, -33°C/min de 5°C até -80°C e, -10°C/min de -80°C até -120°C.

** - 0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização, -15°C/min de 5°C até -80°C e, -10°C/min de -80°C até -120°C.

Ainda, com referência a MPI avaliada em diferentes etapas do processo de congelção, foi encontrada diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre as três etapas estudadas *in natura* diluído até 5°C, 5°C até -55°C e -55°C até -196°C, gráfico 3. Pode-se notar que a medida que o processo de congelção avança diminui a quantidade de MPI dos espermatozoides.

Letras diferentes (a, b, c) sobre barras indicam diferenças estatística.

Gráfico 3 - Médias ($\pm$ erros padrão) da redução da porcentagem de células com integridade da membrana plasmática (MPI) avaliados nas seguintes etapas do processo de congelamento: (*in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C).

7.4. Avaliação da integridade do acrossomo dos espermatozoides durante o processo de congelamento

A porcentagem média das integridades dos acrossomos (AI) estão descritas na tabela 4. A integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides nas avaliações *in natura* diluído e 5°C diferiram significativamente das avaliações -55°C e -196°C no processo de congelamento.

Não houve diferença estatística entre *in natura* diluído e 5°C e entre -55°C e -196°C. Entretanto, até a etapa de avaliação -55°C a curva 1 (-33°C/min) mostrou-se eficiente na conservação de AI. Porém, entre -55°C e -196°C ocorreu uma redução da integridade acrossomal de 7,1%, enquanto que, a curva 2 (-15°C/min) de apenas 0,3%.

Tabela 4 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de espermatozoides com integridade acrossomal (AI) avaliados em diferentes etapas do processo de congelamento.

Etapas de avaliação	AI (%)	
	*Curva 1	**Curva 2
<i>In natura</i> diluído	86,0 $\pm$ 1,0 ^a	86,0 $\pm$ 1,0 ^a
5°C	87,7 $\pm$ 0,7 ^a	84,7 $\pm$ 0,8 ^a
-55°C	84,0 $\pm$ 0,8 ^b	81,2 $\pm$ 1,2 ^b
-196°C	78,0 $\pm$ 1,5 ^b	81,5 $\pm$ 1,2 ^b

Valores seguidos por letras diferentes (^{a, b}) sobrescritos na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$).

*-0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização - 33°C/min de 5°C até -80°C e, -10°C/min de -80°C até -120°C.

** - 0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização, -15°C/min de 5°C até -80°C e, -10°C/min de -80°C até -120°C.

Com relação, as avaliações da integridade de acrossomo em diferentes etapas do processo de congelamento, assim, exposto no Gráfico 4. Verificou-se diferença estatística ($P < 0,05$) entre a etapa *in natura* diluído até 5°C e as etapas 5°C até -55°C e -55°C até -196°C, demonstrando que ocorre maior redução da AI está entre 5°C e -196°C.

Letras diferentes (a, b) sobre barras indicam diferenças estatística.

Gráfico 4 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de redução de células com integridade acrossomal (AI) avaliados nas seguintes etapas do processo de congelamento: (*in natura* diluído até 5°C; 5°C até -55°C e de -55°C até -196°C).

7.5. Avaliação do potencial mitocondrial dos espermatozoides durante o processo de congelamento

Os valores médios da redução de espermatozoides com potencial mitocondrial (APM) ocorrem gradativamente, como mostra a Tabela 5, avaliados *in natura*, 5°C, -55°C e -196°C estão expressos na tabela 5. Como resultado, notou-se que o processo de congelamento leva a redução de células com potencial mitocondrial ($P < 0,05$) em todos os momentos avaliados.

Entretanto, não ocorre diferença entre as curvas de congelamento. Porém, existe uma diferença numérica entre as duas. A curva 1 (-33°C/min) preserva mais a MPI até -55°C, mas de -55°C até -196°C, ocorre uma inversão, como apresentado abaixo, onde a curva 1 (-33°C/min) perdeu 43,4% e a curva 2 (-15°C/min) 22,7% da APM.

Tabela 5 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de células com potencial mitocondrial (APM) nas diferentes etapas do processo de congelamento.

Etapas de avaliação	APM (%)	
	*Curva 1	**Curva 2
<i>In natura</i> diluído	67,0 $\pm$ 1,6 ^a	67,0 $\pm$ 1,6 ^a
5°C	53,3 $\pm$ 2,4 ^b	52,9 $\pm$ 2,5 ^b
-55°C	46,0 $\pm$ 2,7 ^c	36,5 $\pm$ 2,1 ^c
-196°C	26,0 $\pm$ 2,1 ^d	28,2 $\pm$ 2,3 ^d

Valores seguidos por letras diferentes (^{a, b, c, d}) sobrescritos na mesma coluna diferiram significativamente ($P < 0,05$).

*-0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização - **33°C/min** de 5°C até -80°C e, -10°C/min de -80°C até -120°C.

** - 0,25°C/min de 22°C até 5°C, com período de 20 minutos para estabilização, **-15°C/min** de 5°C até -80°C e, -10°C/min de -80°C até -120°C.

Em relação ao estudo de APM em diferentes etapas, mostrou que o processo de congelamento causou redução da porcentagem média de espermatozoides com potencial mitocondrial significativa ($P < 0,05$) entre as avaliações *in natura* diluído até 5°C, 5°C até -55°C e de -55°C até -196°C, como mostra os resultados no Gráfico 5. Sendo que, o intervalo entre -55°C e -196°C o que mais observou-se redução do potencial mitocondrial.

Letras diferentes (a, b, c) sobre barras indicam diferenças estatística.

Gráfico 5 - Médias ($\pm$ erros padrão) da porcentagem de redução de células com potencial mitocondrial (APM) nas seguintes etapas do processo de congelamento: (*in natura* diluído até 5°C; 5°C até -55°C e de -55°C até -196°C).

8. DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços nas técnicas de criopreservação, ainda há muito a se estudar sobre os momentos mais críticos do processo de congelamento e quais os danos mais frequentes em cada etapa. Neste estudo, foram avaliados quatro estágios progressivos da criopreservação: *in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C, além do processo de refrigeração, da congelamento, do *supercooling* dentro da congelamento. Em cada momento do processo foi verificado a porcentagem média de espermatozoides com integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e potencial mitocondrial, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, potencial mitocondrial e despolimerização do citoesqueleto de actina.

Em relação a refrigeração corpórea para temperatura ambiente (37°C para $\pm 20^\circ\text{C}$) não parece ocasionar danos a célula espermática quando refrigerado de forma rápida ($-0,7^\circ\text{C}/\text{min}$) (KAYSER et al., 1991; MORAN et al., 1992). Entretanto, entre (19°C a 8°C) um momento importante onde por ação da redução da temperatura a membrana espermática passa de uma fase líquida para fase gel (MORAN et al., 1992; KATILA, 1997) e, pensando na preservação da célula espermática do choque frio nesse momento crítico, Douglas-Hamilton e colaboradores (1984) e Varner et al. (1988) obtiveram melhores resultados para manutenção da motilidade espermática do espermatozoide utilizando uma curva de refrigeração lenta ($0,33^\circ\text{C}/\text{min}$) em uma temperatura de armazenamento variando de 4°C a 5°C. No entanto, foi observado neste estudo que este tipo de curva de refrigeração realizada de forma lenta ($0,25^\circ\text{C}/\text{min}$) causou significativamente maior ($P < 0,05$) despolimerização do citoesqueleto de actina (redução de 42,5%) durante a etapa de refrigeração, quando comparado com as etapas de *supercooling* (19,2%) e congelamento (16,2%). Inversamente ao encontrado no citoesqueleto, a membrana acrossomal foi a menos afetada pelo processo de refrigeração, onde apenas (0,5%) das células foram lesionadas, nesta etapa.

Notavelmente, o processo de refrigeração realizado de forma lenta ($0,25^\circ\text{C}/\text{min}$) causou maior despolimerização do citoesqueleto, porém, quando trata-se de integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial, não a etapa que mais influenciou a redução de células integras, principalmente a integridade acrossomal. Estes resultados estão de acordo aos encontrados por Januskauskas et al. (1999) em espermatozoides de touros, os quais observaram diferença entre uma curva de refrigeração ($4,2^\circ\text{C}/\text{min}$) e ($0,1^\circ\text{C}/\text{min}$) da temperatura ambiente até 4°C. Contudo, a redução da porcentagem média de células com integridade

das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial foi maior no período entre -55°C até -196°C, isto ocorreu porque a integridade da membrana plasmática e o potencial mitocondrial sofreram maior porcentagem de redução neste período interferindo no resultado final e provavelmente pela variação individual entre o sêmen dos garanhões e ejaculados. Ainda que, nesta etapa do processo de congelamento, as lesões podem também serem resultado da soma das lesões decorrentes das etapas anteriores.

Embora o citoesqueleto de actina seja constituído por uma rede de filamentos cuja remodelagem frequente é importante para mobilidade e determinação da forma (SMALL et al., 1999), a criopreservação pode provocar mudanças definitivas nas redes de filamentos do citoesqueleto, as quais teriam impacto direto na fertilidade (HALL et al., 1993; NARESH, 2016). No experimento, se observarmos a despolimerização de actina entre as etapas de refrigeração, *supercooling* e congelamento, como mostrado no gráfico 1, fica claro que a etapa mais prejudicial ocorre durante o processo de refrigeração, entretanto se avaliarmos progressivamente o processo de congelamento (*in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C; Tabela 1) nota-se que a despolimerização da actina foi aumentando ao longo do processo de congelamento ($P < 0,05$), provavelmente pela soma de efeitos decorrentes das etapas anteriores.

Contudo, como a refrigeração causa maior despolimerização, como descrito no parágrafo anterior. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Hall et al. (1993) em células endoteliais, onde a refrigeração causou despolimerização do citoesqueleto, no entanto, após o aquecimento, as células pareciam retornar ao normal, porém, foi observado aparência anormal do citoesqueleto, sugerindo que esse período de instabilidade pode ter causado consequências mecânicas. Tais resultados contrariam os encontrados por Naresh (2016), onde em espermatozoides de búfalos, os processos de refrigeração e congelamento estimularam a polimerização de actina. Por outro lado, Correa et al. (2007) observou alterações no citoesqueleto de actina de espermatozoides de macaco quando expostos a redução de temperatura e diferentes osmolaridades. Geralmente uma desestabilização da estrutura dos filamentos de actina gera despolimerização, provocando o desequilíbrio do monômero ao filamento (COOPER, 1987).

Macías-García et al (2012) sugeriram que o citoesqueleto de actina, membrana plasmática e potencial mitocondrial de espermatozoides equinos podem ser afetados também pela utilização de crioprotetores com baixa capacidade de penetração, provavelmente isto ocorra pela desidratação ser realizada de forma lenta e desta forma, a célula espermática ficam expostas ao crioprotetor por um maior período de tempo causando uma rápida despolimerização dos filamentos de actina, sugerindo que esses danos podem estar ligados ao efeito osmótico.

Têm sido descrito a décadas que a curva de congelação rápida é a que melhor otimiza a congelação de qualquer sistema celular por reduzir a formação de gelo intracelular (MAZUR, 1972). Levando isto em consideração, um dos propósitos deste estudo foi verificar se uma curva lenta ($-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$) lesaria mais a célula espermática, do que uma curva rápida ($-33^{\circ}\text{C}/\text{min}$) durante o *supercooling*. No entanto, para nossa surpresa, as duas curvas apresentaram valores semelhantes não só para o momento onde provavelmente ocorre o *supercooling*, mas para todo o processo de congelação.

Sendo dados similares aos descritos por Devireddy et al. (2002) e Maziero (2010) que observaram que os espermatozoides de garanhões sobrevivem a curvas de congelação de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Entretanto, Moore et al. (2006) obteve resultados semelhantes características de motilidade espermática utilizando curvas de congelação que variavam de $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ à $-50^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sendo que à $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ foi encontrado o melhor resultado.

Estes resultados obtidos no estudo, não só opõem aos trabalhos mais antigos, como também trabalhos recentes com garanhões, como o de Pugliesi et al. (2015) que descreveram que uma curva de congelação rápida (queda de $-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$) proporciona maior integridade de membrana plasmática, motilidade progressiva e vigor. Concordando com Pugliesi et al. (2015), Woelders et al. (2005) sugeriram que os espermatozoides de javalis são instáveis em temperaturas inferiores a 0°C , e que o sêmen, por este motivo deveria ser submetido durante o início do processo de congelação até a temperatura de nucleação a uma curva relativamente rápida ($-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$) para induzir a nucleação do gelo rapidamente.

Dada a variação que pode ocorrer na qualidade espermática entre garanhões, sendo este, um fator que poderia talvez explicar uma redução de mais de 50% da integridade da membrana plasmática e potencial mitocondrial ao término do experimento. Neste estudo, a porcentagem média de espermatozoides com membrana plasmática intacta reduziu significativamente ao longo do processo de congelação. Onde, no início do processo de congelação apresentava (66%) de células com membrana plasmática íntegra e, foi sendo lesada ao longo da congelação, tendo redução de mais de 50% das células com membrana plasmática íntegras, como apresentado na tabela 3. Sendo, tal resultado similar entre curva rápida ($-33^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e lenta ($-15^{\circ}\text{C}/\text{min}$), portanto não sofreu influência do tipo de curva utilizado. Tais resultados, são similares aos de Thurston et al. (2003) e Medrano et al. (2009), que utilizaram curvas variando entre ($-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-80^{\circ}\text{C}/\text{min}$) que não encontraram diferença para integridade das membranas plasmática e acrossomal pós descongelação, entre as curvas. Porém, eles observaram que entre -5°C e -80°C ,

a integridade da membrana plasmática foi melhor, utilizando curvas de congelação entre -30°C/min e -80°C/min.

Com os resultados obtidos é possível notar no gráfico 3, que a medida que o processo de congelação avança reduz a porcentagem de espermatozoides com integridade da membrana plasmática, sendo mais efetivo entre -55°C até -196°C; 35%, quando comparado com as etapas de refrigeração (*in natura* diluído até 5°C; 15,5%) e etapa de congelação de 5°C até -55°C; 23,4%. Isto corrobora com resultados encontrados por Parks e Graham (1992) e Watson (2000), os quais afirmaram que a integridade da membrana plasmática e acrossomal são afetadas pelo processo de criopreservação. No entanto, acreditava-se que seria pela formação de gelo intracelular, porém, Morris et al. (2007) utilizaram crioscopia (*Cryo Scanning Electron Microscopy* – *Cryo SEM*) concluíram que não ocorre a formação de gelo intracelular durante o processo de congelação, mas que, o dano celular é resultado de um desequilíbrio osmótico durante a congelação/descongelação.

As mitocôndrias presentes nas células espermáticas tem como principal função a produção de ATP por fosforilação oxidativa. Dada tamanha importância das células mitocondriais para os espermatozoide, foi observado neste estudo, assim como em outros, que o processo de congelação causa redução do potencial mitocondrial. No entanto, no nosso estudo conseguimos observar as etapas individualmente. Como descrito na Tabela 5, o potencial mitocondrial é reduzido ao longo do processo de congelação, onde inicia a criopreservação com (67%) de células com potencial mitocondrial e ao término do processo em torno de (27%), ou seja, sofre uma redução de mais de (50%) do seu potencial mitocondrial. Contudo, como era esperado não houve diferença entre a curva rápida (-33°C/min) e lenta (-15°C/min). Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Schober et al. (2007), os quais observaram que temperaturas decrescentes alteram os parâmetros bioenergéticos das mitocôndrias durante o processo de congelação, havendo uma diminuição da respiração celular, um aumento da oxidação do citocromo c^{2+} e queda do potencial da membrana mitocondrial, isso prevê os efeitos negativos da criopreservação do sêmen na fertilidade.

Esperávamos que a integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial, integridade da membrana plasmática e o potencial mitocondrial, sofressem mais danos durante a etapa de *supercooling*, entretanto, como apresentado no gráfico 5, a maior redução do seu potencial mitocondrial ocorreu durante o processo final de congelação (33,8%) que compreende entre -55°C até -196°C quando comparado a etapa de refrigeração (20,4%) etapa entre (*in natura* diluído até 5°C) e ao momento onde provavelmente ocorre o *supercooling*.

(21,7%) etapa correspondente (5°C a -55°C). Resultados apoiam os encontrados por Reers et al. (1991); Ortega-Ferrusola et al. (2009) e Peña et al. (2009), afirmaram que as estruturas mitocondriais são sensíveis aos processos de refrigeração e congelamento. Watson (1995), abordou ainda a formação de cristais de gelo no interior da mitocôndria, provocando uma provável redução da produção de ATP, fato que poderia ocorrer em nosso estudo por estarmos usando uma curva de congelamento rápida (-33°C/min), porém, não encontramos diferenças entre a curva rápida e lenta (-15°C/min).

Pouco se sabe sobre a importância do *supercooling* para célula espermática de equinos e outras espécies. Apesar de não conseguirmos marcar o momento exato onde a célula sofre o *supercooling*, o que realmente é muito difícil de fazer, principalmente pelas variações que ocorrem no sêmen entre diferentes garanhões e ejaculados. No entanto, conseguimos analisar um intervalo de temperaturas onde provavelmente ocorre o *supercooling*. No intervalo entre (0°C e -55°C), momento onde provavelmente as células sofrem com uma redução da temperatura abaixo do seu ponto de fusão e quando retorna para a temperatura de congelamento ocorre a liberação de calor latente e dá-se início à nucleação. Acreditávamos que essa etapa do processo de congelamento seria a mais danosa para as membranas plasmática, acrossomal, potencial mitocondrial e citoesqueleto e, que haveria diferença entre as curvas de congelamento rápida (-33°C/min) e lenta (-15°C/min) porém, apenas a membrana acrossomal foi mais afetada neste período, apresentando uma redução de (4,2%) da sua integridade, entretanto este momento não se diferenciou estatisticamente da etapa -55°C e -196°C.

Alguns autores falam sobre os fatores que desencadeiam o *supercooling*, Devireddy et al. (2002) relataram que essa liberação de calor latente está relacionado às alterações de volume que ocorrem durante a congelamento. Entretanto, Morris e Acton (2013), relataram que é um importante formador de gelo intracelular. Os resultados que obtivemos não foram encontradas diferenças entre as curvas de congelamento rápida (-33°C/min) e lenta (-15°C/min) na etapa onde provavelmente ocorre o *supercooling*, para os parâmetros analisados.

Zavos e Graham (1983) relataram que quanto mais tempo a célula fica exposta ao *supercooling*, menor será a temperatura de nucleação e pior a sobrevivência espermática. Fato que não encontramos em nosso estudo, já que provavelmente a célula ficaria mais tempo exposta ao *supercooling* quando utilizado uma curva de congelamento lenta. Apesar disso, não houve diferença estatística entre as curvas de congelamento.

Dentre os muitos fatores necessários para que ocorra a fertilização, manter a integridade acrossomal é essencial, porque no acrossomo, estão contidas as enzimas acrossomais que

são liberadas durante a reação acrossomal essenciais para penetração do espermatozoide na zona pelúcida e ligação com a membrana plasmática do oócito (FLESCHE e GADELLA, 2000). Neste estudo, observamos que a integridade da membrana acrossomal foi a que menos sofreu influência com o processo de congelamento, iniciando a criopreservação com (86%) de integridade e ao término apresentava em torno de (80%) de integridade. Sendo que na etapa onde provavelmente ocorre o *supercooling* entre 5°C até -55°C e etapa final de congelamento -55°C até -196°C, os momentos que mais afetaram o acrossomo, ainda assim, sofreu uma redução de (4,2% e 3,8%, respectivamente).

Concordando com os nossos resultados e dada a importância da reação acrossomal para que ocorra fertilização, Neild et al. (2003), avaliaram o estado de capacitação do sêmen de garanhões utilizando coloração com clortetraciclina (CTC) e integridade de membrana acrossomal com Hoechst 33258, onde foi observado um aumento de espermatozoide de capacitadas ao longo do processo de congelamento, além de, redução da integridade da membrana acrossomal. Assim, como nós, Neild et al. (2003), não encontrou efeito do *supercooling* sobre a integridade acrossomal.

Com relação, a integridade acrossomal entre as duas curvas de congelamento utilizadas, rápida (-33°C/min) e lenta (-15°C/min), não encontramos diferença estatística entre as duas curvas. Similarmente, aos resultados obtidos, neste estudo, Thurston et al. (2003) não encontraram diferença para integridade acrossomal de espermatozoide de javali, utilizando uma curva de congelamento de (-6°C/min) e (-40°C/min).

Apesar de, não termos utilizado nesse estudo diferentes crioprotetores, estes não deixam de ser um importante componente do processo de congelamento. Como vem sendo discutido a quase 70 anos, a importância e qual o melhor crioprotetor para cada espécie. A descoberta do glicerol por Polge et al. (1949) foi um marco para congelamento de sêmen. Apesar disso, há a necessidade frequente de investigar crioprotetor que proporcione melhor ambiente para criopreservação, visando minimizar danos as membranas plasmáticas, acrossomal e potencial mitocondrial (LOOMIS e SQUIRES, 2005), e ainda, iniciar estudos sobre a importância dos crioprotetores na despolimerização do citoesqueleto de actina.

Os resultados deste experimento, mostram que houve um grande efeito do processo de congelamento e da descongelamento, principalmente sobre a integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e potencial mitocondrial, integridade da membrana plasmática, potencial mitocondrial e integridade acrossomal, no momento entre -55°C e -196°C, isto traz a necessidade de maiores estudos nesse período. Como já é conhecido e relatado há décadas, o processo de

descongelção acarreta danos aos espermatozoides (AMAN e PICKET, 1987), tais danos que podem ser resultado do efeito solução, a ocorrência de ambiente hipotônico, levando ao influxo de água para dentro da célula, ocasionando seu rompimento (HOLT, 2000 e PEÑA et al., 2012).

Muitos pesquisadores como Aman e Picket (1987), Holt (2000) e Morris et al. (2007), defendem a ideia que se a congelção foi realizada de forma lenta, a descongelção também deverá ser lenta para evitar o influxo de grande volume de água para dentro da célula e se a congelção for realizada utilizando uma curva rápida, a descongelção deve ser realizada de forma rápida para evitar que estas fiquem expostas ao meio hipertônico por longo período de tempo. Entretanto, nesse estudo não encontramos diferença estatística entre a curva rápida (-33°C/min) e lenta (-15°C/min) após descongelção para nenhum parâmetro estudado. Tanto, para curva rápida ou lenta, a descongelção foi realizada em banho maria a 37°C durante 30 segundos.

Perante isto, os resultados encontrados acompanham toda literatura disponível, da qual sabe-se que o processo de congelção causa danos irreversíveis ao espermatozoide. No entanto, este estudo permitiu avaliar progressivamente a resposta biológica do espermatozoide equino durante a criopreservação e obter uma compreensão dinâmica e quantitativa dos momentos mais críticos para integridade das membranas plasmáticas, acrossomal e potencial mitocondrial, integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal, potencial mitocondrial e despolimerização do citoesqueleto.

9. CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados encontrados, para as técnicas utilizadas, pode-se concluir que o processo de congelamento:

Conclusão geral

- ✓ O processo de congelamento causa danos irreversíveis ao espermatozoide, no entanto, este estudo permite avaliar progressivamente a criopreservação e identificar os momentos mais críticos de acordo com as técnicas utilizadas.

Conclusões específicas

- ✓ O processo de refrigeração induz a despolimerização do citoesqueleto de actina.
- ✓ A despolimerização do citoesqueleto de actina não influencia diferentes curvas de congelamento.
- ✓ O *supercooling* não foi a etapa que mais provocou despolimerização do citoesqueleto de actina nas diferentes curvas de congelamento.
- ✓ As membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial, citoesqueleto e células com integridade de membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial sofreram redução de células integras durante todo o processo de congelamento (*in natura* diluído, 5°C, -55°C e -196°C).
- ✓ A etapa do processo de congelamento de -55°C e -196°C provocou maior redução de células com integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial.
- ✓ A membrana acrossomal foi a que menos sofreu danos durante todo o processo de congelamento.
- ✓ Não houve influência das diferentes curvas de congelamento (curva rápida -33°C/min e a curva lenta -15°C/min) sobre as características espermáticas avaliadas.
- ✓ A porcentagem de células com integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial não foram influenciados pelo *supercooling*.

10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, n.3, p.145-173, 1987.

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

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

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (casa) e da morfometria (asma)**. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2000.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa**. 1989.

BENSON, J.D.; WOODS, E. J.; WALTERS, E. M.; CRITSER, J. K. (The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v.78, n.8, p.1682-1699, 2012.

BRENER, E.; RUBINSTEIN, S.; COHEN, G.; SHTERNALL, K.; RIVLIN, J.; BREITBART, H. Remodeling of the Actin Cytoskeleton During Mammalian Sperm Capacitation and Acrosome Reaction. **Biology of Reproduction**, v.68, n.3, p.837-845, 2003.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E. C. C.; DE ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J. S.; DE ARRUDA, R. P. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.6, p.1285-1292, 2010.

CORREA, L.M.; THOMAS, A.; MEYERS, A.S. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility. **Biology of Reproduction**, v.77, n.6, p.942-953, 2007.

COUNTERS, J.L.; EKWALL, H.; DAQUIGNON, M.; PLOEN, L. Preliminary study of water and some element contents in boar spermatozoa, before, during on after freezing. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p. 613-626, 1989.

COOPER, J. A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. **The Journal of Cell Biology**, v. 105, n. 4, p. 1473-1478, 1987.

CROCKETT, E. C.; GRAHAM, J. K.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. **Theriogenology**, v. 55, n. 3, p. 793-803, 2000.

DEVIREDDY, R.V.; SWANLUND, D.J.; OLIN, T.; VINCENTE, W.; TROEDSSON, M.H.T.; BISCHOF, J.C.; ROBERTS, K.P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 222-231, 2002.

DILLER, K. R. Intracellular freezing: Effect of extracellular *supercooling*. **Cryobiology**, v. 12, n.5, p. 480-485, 1975.

DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, n.3, p.291-304, 1984.

GARCIA, B.M.; MORAN, A.M.; FERNANDEZ, L.G.; FERRUSOLA, C.O.; RODRIGUEZ, A.M.; BOLANOS, J.M.; DA SILVA, C.M.; MARTINEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. The Mitochondria of Stallion Spermatozoa Are More Sensitive Than the Plasmalemma to Osmotic-Induced Stress: Role of c-Jun N-terminal Kinase (JNK) Pathway. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, p. 105-113, 2012.

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

GILMORE, J. A.; MCGANN, L. E.; LIU, J.; GAO, D. Y.; PETER, A. T.; KLEINHANS, F. W., E CRITSER, J. K. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.53, n.5, p.985-995, 1995.

GUTHRIE, H. D.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 67, n.6, p. 1811-1816, 2002.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, n.1, p.73-88, 1990.

HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. **Science**, v. 279, n. 5350, p. 509-514, 1998.

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

JONES, R.T.; MARTIN, I.C.A. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.35, p. 311-320, 1973.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1217-1227, 1997.

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, n.4, p.601-614, 1992.

KUMAR, S.; MILLAR, J. D.; WATSON, P. F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. **Cryobiology**, v. 46, n. 3, p. 246-253, 2003.

LOOMIS, P. R.; SQUIRES, E. L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, p. 480-491. 2005.

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

MACIAS GARCIA, B.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; APARICIO, I. M.; MIROMORAN, A.; MORILLO RODRIGUEZ, A.; GALLARDO BOLANOS, J. M.; GONZALEZ FERNANDEZ, L.; BALAO DA SILVA, C. M.; RODRIGUEZMARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PENA,

F. J. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. **Theriogenology**, v.77, p. 1280-1289, 2012.

MAZIERO, R. R. D. **Comparação entre diferentes taxas de congelação e volumes de armazenamento de sêmen na viabilidade espermática em garanhões de alta e baixa congelabilidade**. 2010. 94p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v.247, n.3, p.C125-C142, 1984.

MAZUR, P.; KOSHIMOTO, C. Is intracellular ice formation the cause of death of mouse sperm frozen at high cooling rates?. **Biology of Reproduction**, v.66, n.5, p.1485-1490, 2002.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327-344, 2002.

MEDRANO, A.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. **Andrologia**, v. 41; p. 246–250, 2009.

MELO, C. M. **Efeito do armazenamento por 24 horas em diferentes sistemas de refrigeração sobre a viabilidade e fertilidade de sêmen congelado equino** -2005, 101f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, São Paulo, 2005.

MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.999-1012, 1992.

MORRIS, L. H.; ALLEN, W. R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. **Equine Veterinary Journal**, v.34, n.1, p.51-60, 2002.

MORRIS, G. J. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. **Human Reproduction**, v. 21, n. 8, p. 2075-2083, 2006.

- MORRIS, G. J.; FASZER, K.; GREEN, J.E.; DRAPER, D.; GROUT, B.W.W.; FONSECA, F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. **Theriogenology**, v.68, n.5, p.804-812, 2007.
- MORRIS, G. J. e ACTON, E. Controlled ice nucleation in cryopreservation-a review. **Cryobiology**, v.66, n.2, p.85-92, 2013.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; BRUEMMER, J. E.; GRAHAM, J. K. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 5, p. 215-218, 2006.
- NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides eqüinos criopreservados**. 2006. 109 f. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2006.
- NARESH, S. Effect of cooling (4°C) and cryopreservation on cytoskeleton actin and protein tyrosine phosphorylation in buffalo spermatozoa. **Cryobiology**, v.72, n.1, p.7-13, 2016.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2007. **Nutrient Requirement of Horses**. 6ª Edição, 2007.
- NEILD, D. M.; GADELLA, B. M.; CHAVES, M. G.; MIRAGAYA, M. H.; COLENBRANDER, B.; AGÜERO, A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 59, n. 8, p. 1693-1705, 2003.
- ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MORRELL, J. M.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, p. 55-63. 2009.
- OZKAVUKCU, S.; ERDEMLI, E. Cryopreservation: basic knowledge and biophysical effects. **Journal of Ankara Medical School**, v.24, n.4, p.187-196, 2002.
- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.

PEÑA, F. J.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J. A.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZALEZ FERNANDEZ, L.; MACIAS GARCIA, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 345-349, 2009.

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

PEÑA, F. J.; FERRUSOLA, C. O.; TAPIA, J. A.; APARICIO, I. M. How stallion sperm age in vitro? Scenario for preservation technologies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 451–454, 2012.

PRICKETT, R. C.; MARQUEZ-CURTIS, L.A.; ELLIOTT, J.A.W.; McGANN, L.E. Effect of *supercooling* and cell volume on intracellular ice formation. **Cryobiology**, v.70, n.2, p.156-163, 2015.

POLGE, C., SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, n.4172, p.666, 1949.

PUGLIESI, G.; FÜRST, R.; CARVALHO, G. R. Impact of using a fast-freezing technique and different thawing protocols on viability and fertility of frozen equine spermatozoa. **Andrologia**, v. 46, n. 9, p. 1055-1062, 2014.

QUINN, P. J. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 21, n. 1, p. 3-19, 1989.

RAPHAEL, C.F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide equino refrigerado**. 2007.111f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

REERS, M., SMITH, T.W., CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v.30, n.18, p.4480-4486, 1991.

SALAZAR, J. L.; TEAGUE, S. R.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Effect of cryopreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 409-418, 2011.

SCHOBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 745-754, 2007.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Sperm membrane behavior during cooling and cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, n.S3, p.20-26, 2015.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, WILLEM, F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v.169, p.2-5, 2016.

SQUIRES, E. L.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; REGER, H. P.; BRUEMMER, J. E. Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. In: Proceedings of the 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, New Orleans, Louisiana, USA, 21-25 November 2003. **American Association of Equine Practitioners (AAEP)**, p. 353-356, 2003.

THURSTON, L.M.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. **Theriogenology**, v. 60, p.101-113, 2003.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 29, n. 5, p. 1043-1054, 1988.

ZAVOS, P. M.; GRAHAM, E. F. Effects of various degrees of *supercooling* and nucleation temperatures on fertility of frozen turkey spermatozoa. **Cryobiology**, v.20, n.5, p.553-559, 1983.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, n.4, p.871-891, 1995.

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

WOELDERS, H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Veterinary Quarterly**, v. 19, n. 3, p. 135-138, 1997.

WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; ZUIDBERG, C. A.; CHAVEIRO, A. E. N. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 383-395, 2005.

ANEXO A

- Coloração dos filamentos de actina (Protocolo adaptado de BRENER et al., 2002 e PEÑA et al., 2012).

Preparação das lâminas de Poli-L-Lisina

- Diluição 1:10 (1 parte de Poli-L-Lisina em 10 partes de água Mili-Q);
 - Incubar a lâmina durante 7 minutos na solução;
 - Secar durante 1 hora na estufa a 37°C;
 - Armazenar na geladeira a 4°C.
1. Diluir o sêmen em DPBS para concentração final de 50×10^6 spz/mL;
 - 25µL de sêmen em 75µL de DPBS (1x).
 2. Confecção dos esfregaços;
 3. Secar 10 min em temperatura ambiente;
 4. Deixar 10 min no formol (4%);
 5. Lavar levemente em DPBS;
 6. Deixar 10 min em acetona gelada;
 7. Deixar secar 10 min em temperatura ambiente;
 8. Deixar 10 min na cuba com TBS (10x) + 1% de BSA
 9. Incubar por 1 hora em FITC-faloidina (0,2Mm);
 10. Fazer a leitura em microscopia de epifluorescência;
 11. Contar 200 células.