



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**USO DE SACAROSE COMO SUPLEMENTO EM DILUIDOR PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES**

THALLES CLOVES MACIEL DE MOURA

RECIFE-PE

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**USO DE SACAROSE COMO SUPLEMENTO EM DILUIDOR PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES**

THALLES CLOVES MACIEL DE MOURA

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof.^a. Dr.^a. Maria Madalena Pessoa Guerra

RECIFE-PE

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Nome da Biblioteca, Recife-PE, Brasil

M929u Moura, Thalles Cloves Maciel de
Uso de sacarose como suplemento em diluidor para criopreservação de sêmen
de garanhões / Thalles Cloves Maciel de Moura. – 2017.
58 f. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências e apêndice(s).

1. Crioprotetor 2. Sacarose 3. Citometria de fluxo 4. Criopreservação
5. Sêmen equino I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

USO DE SACAROSE COMO SUPLEMENTO EM DILUIDOR PARA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES

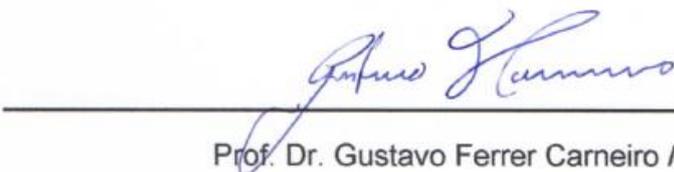


THALLES CLOVES MACIEL DE MOURA

Dissertação aprovada em 2 de Agosto de 2017



Prof.ª. Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra / DMV- UFRPE



Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro / UFRPE- UAG



Prof. Dr. Diogo Ribeiro Câmara / UFAL



Dr. Helder Melo de Souza

AGRADECIMENTOS

A minha família, a quem devo grande parte das minhas conquistas;

À minha orientadora, Prof.^a Madalena Guerra, que contribuiu com a minha formação desde a graduação. Muito obrigado por ter a oportunidade de ser seu orientado!

Á toda equipe do ANDROLAB (André, Lúcia, Robespierre, Mergulhão, Juliane, Millena e Aline), pela paciência, contribuição, troca de informações e companheirismo durante esse período de grande aprendizado;

À doutoranda Raquel Freitas do laboratório de Enzimologia (LABENZ) pela ajuda em meu experimento. Muito obrigado!

A CAPES pelo apoio financeiro;

Aos meus parentes e amigos que sempre torcem por mim, obrigado pelas palavras!

Aos professores do PGCAT, que ministraram as disciplinas colaborando para meu conhecimento;

À Livia da CIAVET, que me concedeu amostras do Botucrio® para realização da minha pesquisa;

Ao Marcelo (Haras Cascatinha), Eduardo Arruda e ao Médico Veterinário Igor Nery, por permitirem o uso de seus animais para o experimento;

Aos funcionários dos Haras que ajudaram no manejo dos animais no momento das colheitas;

Aos funcionários da reprodução, Joana e Alcir, que sempre estão dispostos a ajudar os alunos da reprodução. Obrigado pelos serviços prestados e conhecimentos compartilhados!

Agradeço a Deus, por passar este período de grande aprendizado e por todas as bênçãos em minha vida!

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Espermatozoide equino, pós-descongelção, com membrana plasmática íntegra e acrossomal danificada (IP-/PNA+)......	58
Figura 2. Espermatozoide equino, pós-descongelção, com lesão na membrana plasmática e acrossomal (PNA+/IP+)......	58
Figura 3. Dot-plot com subpopulações espermáticas de equinos, pós-descongelção, avaliadas para integridade de membrana plasmática e acrossomal.....	59
Figura 4. Espermatozoide equino, pós-descongelção, com alto potencial de membrana mitocondrial.....	59
Figura 5. Espermatozoide equino, pós-descongelção, com baixo potencial de membrana mitocondrial.....	59

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Parâmetros cinéticos avaliados pelo CASA. Sêmen criopreservado de equino com meio de congelação à base leite/gema, sem sacarose (controle), com Botucrio® (controle positivo) ou suplementado com Sacarose (25 mM, 50 mM e 100 mM). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão.....	56
Tabela 2. Integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estabilidade de membrana mensurados por citometria de fluxo de espermatozoides equinos submetidos a congelação em diluente à base leite/gema, sem sacarose (controle), com Botucrio® (controle positivo) ou suplementado com Sacarose (25 mM, 50 mM e 100 mM). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão.....	57

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CASA – Sistema de Análise Espermática Computadorizada

PBS – Fosfato Salino Tamponado

PNA – *Peanut agglutinin*

IP – iodeto de propídio

M540 – Merocianina 540

YP – YO-PRO[®]-1 iodide

iPAM – integridade de membranas plasmática e acrossomal

JC-1 – Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,10,3,30
tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

MT- Motilidade total

MP – Motilidade progressiva

STR – retilinearidade

VCL – velocidade curvilínea

VSL – velocidade em linha reta

VAP – velocidade média da trajetória

ALH – amplitude lateral da cabeça

WOB – índice de oscilação

BCF – frequência de batimento flagelar

Resumo

O objetivo do estudo foi investigar os efeitos de diferentes concentrações de sacarose sobre a qualidade do sêmen equino pós-descongelamento. Foram utilizados 24 ejaculados obtidos de 6 garanhões da raça Mangalarga Marchador e Campolina, no qual, cada ejaculado foi dividido em 5 grupos: controle (diluidor de congelamento sem sacarose), controle positivo (Botucrio®) e três grupos constituídos do diluidor de congelamento suplementados com Sacarose nas concentrações de 25 mM, 50 mM e 100 mM. As amostras de sêmen foram obtidas com vagina artificial, avaliadas e transportadas (5 °C) para o laboratório. As amostras de sêmen foram diluídas (200×10^6 espermatozoides/mL), envasadas em palhetas e submetidas à congelamento. Imediatamente após descongelamento (37 °C, 30s), as amostras de sêmen foram avaliadas quanto a cinética, integridade das membranas plasmática e acrossomal, estabilidade de membrana e potencial de membrana mitocondrial. A adição de 50 e 100 mM de sacarose ao diluidor de congelamento aumentou ($P < 0,05$) os parâmetros de MT, MP, VCL, VSL e VAP, em relação ao grupo controle. O parâmetro WOB do grupo suplementado com sacarose na concentração de 100 mM foi maior ($P < 0,05$) do que o grupo controle. Maiores valores ($P < 0,05$) de ALH e BCF foram observados nos grupos tratados com sacarose (25, 50 e 100 mM), em comparação ao Botucrio®. O sêmen congelado na presença de 100 mM de sacarose apresentou porcentagens maiores ($P < 0,05$) de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas (PNA-/IP-), e alto potencial de membrana mitocondrial (APMM), quando comparado com o sêmen congelado sem sacarose (grupo controle), com Botucrio® (controle positivo). Conclui-se que a adição de sacarose nas concentrações de 50 e 100 mM ao diluidor à base de leite/gema pode ser um eficiente crioprotetor para congelamento de sêmen equino.

Palavras-chave: Crioprotetor, sacarose, citometria de fluxo, criopreservação, sêmen equino.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	
APOIO FINANCEIRO	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Inseminação artificial em equinos.....	14
2.2 Congelação de sêmen em equinos.....	15
2.3 Danos celulares pós-congelação.....	17
2.4 Crioprotetores.....	18
2.4.1 Dimetilformamida.....	19
2.4.2 Sacarose.....	20
2.5 Métodos de avaliação espermática.....	22
2.5.1 Sistema de Análise Espermática Computadorizada (CASA).....	22
2.5.2 Citometria de fluxo.....	23
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
4 ARTIGO.....	33

1 INTRODUÇÃO

Segundo os dados do IBGE (2016), o Brasil possui o maior rebanho de equinos da América Latina e o terceiro rebanho mundial. Movimentando aproximadamente 16 bilhões de reais e proporcionando cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, onde se destacam os fornecedores de insumos, produtos e serviços (ALMEIDA e SILVA, 2010). Além da importância econômica, a equideocultura contribui no aspecto social, possibilitando atividades de esporte e lazer, como a equoterapia para tratamentos psicomotores (LIMA et al., 2006).

O uso de biotecnologias que possibilitem maior aproveitamento na reprodução no sistema de criação da espécie equina tem sido desde então amplamente empregado por criadores, como as técnicas de criopreservação de sêmen. Entre os principais benefícios, observa-se a diminuição dos custos e riscos no transporte dos animais que se deseja reproduzir, incluindo a possibilidade de uso de animais de países diferentes; controle de doenças; maior aproveitamento de animais geneticamente superiores e possibilidade de utilização do sêmen de garanhões que estão em atividade esportiva, doentes ou que já morreram.

No entanto, ao que se refere à técnica de criopreservação, o espermatozoide equino apresenta baixa resistência ao processo de congelação, refletindo em reduzida taxa de fertilidade do sêmen congelado-descongelado (FERREIRA, 2008).

No Brasil, muitos centros de reprodução equina realizam congelação de sêmen de garanhões com o uso de amidas como crioprotetor, tendo bons resultados de fertilidade a campo (ALVARENGA e PAPA, 2011). O glicerol por sua vez, é o crioprotetor mais usado na espécie equina, diminuindo os efeitos agressivos da congelação e descongelação, apesar do grau de toxicidade (OLIVEIRA et al., 2013). Em virtude de tal limitação, tem se buscado alternativas que possam atuar em associação ao glicerol na formação de

diluentes, sendo a dimetilformamida a mais utilizada (ALVAREZ et al., 2014; WU et al., 2015).

Os açúcares, como crioprotetores não penetrantes, agem minimizando o estresse osmótico durante a congelação, assim como desempenhando importante papel no diluente de congelação (HOLT, 2000). Segundo Yildiz et al. (2000), além de atuarem como crioprotetores, os açúcares são substratos energéticos para o espermatozoide durante a incubação, protegendo também a membrana plasmática durante a congelação e descongelação, através de interações diretas nas membranas plasmática e acrossomal, podendo ter resultados diferentes de acordo com o tipo do açúcar.

A trealose, a lactose e a sacarose já foram descritas como crioprotetores eficazes no processo de criopreservação de sêmen, em trabalho desenvolvido com ratos (PIASSI et al., 2009). Outros experimentos foram realizados usando sacarose, tanto na criopreservação de sêmen de touros (WOELDERS et al., 1997; BÜYÜKLEBLEBICI et al., 2014) quanto de cães (YILDIZ et al., 2000) e gatos (VIZUETE et al., 2014). No entanto, pouco se sabe sobre a atuação do mesmo na espécie equina, havendo a necessidade de realização de mais estudos para avaliar a eficácia da sacarose como crioprotetor no sêmen dessa espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inseminação Artificial em equinos

Bastante utilizada na reprodução, a inseminação artificial (IA) em equinos é uma ferramenta que traz vários benefícios, como o maior controle de doenças, diminuição de riscos de acidentes por monta natural, maior número de potros filhos de um mesmo garanhão e redução de custos quando se quer crias de animais que estão em locais distantes. É uma técnica já disseminada em todo o mundo, mais comumente utilizada com uso de sêmen refrigerado (LOOMIS, 2006).

Acredita-se que a primeira espécie a ser submetida à IA com sucesso foi a equina, mas o interesse por esta técnica persiste até os dias de hoje, sendo usada na maioria de suas raças (ALLEN, 2005). Além disso, a IA é a base para outras biotecnologias, desde a transferência de embriões até a clonagem, ganhando aceitação crescente nos últimos 25 anos na criação de cavalos (AURICH, 2012).

Segundo Loomis (2006), uma vez que a colheita de sêmen é realizada em sistema diferente da monta natural (sendo a monta natural um circuito fechado), deve-se ter o cuidado com o manejo do ejaculado obtido através de colheita por vagina artificial, que pode ser prejudicado por alterações de temperatura, pressão osmótica ou exposto a agentes contaminantes.

A diluição do sêmen para uso na IA deve ser feita em meio adequado para que maximize a longevidade dos espermatozoides, uma vez que irá influenciar a manutenção da integridade de membrana e do DNA, e, conseqüentemente, seu potencial de fertilização (LOVE et al., 2001). Uma boa diluição necessita de volumes precisos (por proporção), boa concentração de espermatozoide/mL e motilidade progressiva mínima (SAMPER et al., 2004).

A inseminação artificial com sêmen congelado-descongelado se destaca na indústria de criação de cavalos esportivos, sendo as palhetas de sêmen congelado vendidas em todo o mundo com valores consideráveis. No entanto, a capacidade de fertilização do sêmen criopreservado do garanhão é muitas vezes inferior à do sêmen fresco e após a descongelação os espermatozoides não mantêm uma motilidade suficientemente alta para o uso na IA (BATTUT et al., 2017).

No manejo reprodutivo, Ferris et al. (2012) observaram que a maioria das éguas ovulam de 36-42h após a indução com hCG ou deslorelina, estando a égua com folículo pré-ovulatório ≥ 35 mm e edema uterino no momento da administração dos medicamentos.

Para a inseminação com sêmen descongelado (inseminação profunda), é necessária a avaliação diária durante o estro, usando indutores de ovulação (gonadotrofina humana ou hormônio liberador da gonadotrofina) quando um folículo maior que 35 mm é detectado na presença de edema uterino, sendo feito um acompanhamento com uso de aparelho de ultrassom no intervalo de 6 horas (iniciando 24h após a indução), sendo a inseminação realizada logo após detectar a ovulação através de ultrassonografia (ALVARENGA et al., 2016).

2.2 Congelação de sêmen em equinos

Antes de escolher um garanhão para ser usado em um programa de IA, é importante avaliar a capacidade de tolerância dos espermatozoides desse animal aos processos de refrigeração ou congelação, uma vez que o uso dessas biotécnicas pode influenciar significativamente nos resultados desejados (SAMPER et al., 2004). A técnica de criopreservação utilizada deve preservar a integridade das estruturas de um maior número possível de células espermáticas (NASCIMENTO, 2006). Para isso, é necessário escolha adequada da curva de congelação e de um protocolo eficaz.

O sêmen criopreservado do garanhão exhibe alta variabilidade na viabilidade pós-descongelação, sendo classificados como “congeladores pobres” aqueles que apresentam baixa viabilidade após a criopreservação e

como “bons congeladores” aqueles que possuem alta viabilidade pós-descongelação (HOFFMAN et al., 2011).

Quando ocorre algum evento que faça a colheita de sêmen ou acasalamento impossível (lesão ou morte), podem ser colhidos os espermatozoides do epidídimo que possam fertilizar. Nesse caso, os gametas podem ser congelados para uso futuro, porém a fertilidade do sêmen de epidídimo pós-descongelação é menor do que a do sêmen ejaculado (OLACIREQUI et al., 2014).

Há uma estimativa em que 30-40% dos garanhões produzem sêmen adequado para a criopreservação e uma grande variação inter-individual de espermatozoides sobreviventes na congelação (ALVARENGA et al., 2003). Esses fatos limitam o uso generalizado do sêmen congelado na indústria do cavalo, de modo que é necessário uma melhoria do diluente de congelação e dos protocolos. A melhora das técnicas de congelação pode ser obtida através da otimização das curvas de temperatura, tempos de incubação e composição do diluente (BLOMMAERT et al., 2016).

Os diluentes de congelação geralmente contém leite desnatado, gema de ovo e glicerol como agentes crioprotetores (SIEME et al., 2015). Também, podem ser usados outros agentes crioprotetores penetrantes, como o etilenoglicol e dimetilformamida, ou crioprotetores não penetrantes, como os dissacarídeos trealose e sacarose (HOFFMAN et al., 2011; OLDENHOF et al., 2013).

No processo de criopreservação, o sêmen é congelado utilizando uma curva de congelação em duas etapas, sendo que a primeira inicia com a temperatura ambiente e termina quando a temperatura atinge 5 °C, momento em que será realizado o tempo de estabilização, que vai depender do tipo do diluidor. A segunda etapa (curva negativa), tem início com a temperatura de 5 °C e termina quando atinge -196 °C, com uso do nitrogênio líquido. Todo esse procedimento pode ser realizado em máquina de congelação de sêmen ou com uso de caixa de isopor contendo nitrogênio líquido e suporte para palhetas (ALVARENGA et al., 2016).

2.3 Danos celulares pós-congelação

O processo de congelação causa diversas alterações na estrutura dos espermatozoides, principalmente na fase de indução à transição da membrana plasmática, momento em que passa do estado líquido para o estado gel, durante a refrigeração (FÜRST, 2006). Sendo assim, provavelmente, os danos causados à membrana celular e função metabólica deve-se pela alteração no arranjo dos constituintes da membrana durante o choque térmico causado pela baixa temperatura (MEDEIROS et al., 2002).

Além do choque térmico, na criopreservação, há outros eventos que podem causar danos à membrana do espermatozoide, sendo estes a formação de cristais de gelo intracelulares e o efeito solução, no qual os espermatozoides estão em condições hipertônicas na formação de gelo extracelular, resultando na desidratação da célula para manter o equilíbrio entre os meios intra e extracelular, transportando a água para fora da célula, ocorrendo principalmente quando se congela de forma mais lenta. Na descongelação ocorre o inverso, resultando em captação de água e “inchaço” da célula (OLDENHOF et al., 2013; SIEME et al., 2015).

A congelação pode causar danos irreversíveis aos espermatozoides, principalmente na membrana plasmática, quando as células passam da temperatura ambiente para a temperatura de 1 °C. Os fosfolípidos liberados durante essa fase de transição aumentam a permeabilidade, podendo ocorrer a ruptura da membrana e morte celular (AMANN e PICKETT, 1987).

Durante a criopreservação, os espermatozoides sofrem um estresse osmótico severo. Isso ocorre devido à adição e remoção de agentes crioprotetores, além da congelação e descongelação (MAZUR, 2004). A refrigeração altera a estrutura e/ou a organização das células (lipídios, ácidos nucleicos, proteínas), comprometendo suas funções (GOUSSET et al., 2002).

Sob condições fisiológicas, as membranas dos espermatozoides estão em sua fase fluida, no qual são ricas em colesterol e esfingolipídios (BROWN e LONDON, 2000).

Assim, eventos da perda de água e da desidratação celular são efeitos desejáveis na criopreservação, pois reduzem a probabilidade de causar danos às estruturas internas/membrana plasmática, através de grandes canais de gelo nas células (SQUIRES et al., 1999).

2.4 Crioprotetores

Para que a criopreservação do sêmen equino apresente melhores resultados, é fundamental a interação do diluente com a curva de refrigeração e com o crioprotetor utilizado (JASKO, 1994). Os crioprotetores podem ser divididos em duas classes: penetrantes e não penetrantes. Entre os penetrantes encontram-se dimetilsulfóxido, 1,2 propanodiol, glicerol, etilenoglicol e amidas. Os crioprotetores não penetrantes são lactose, manose, frutose, sacarose e alguns polímeros sintéticos, encontrados nas proteínas que estão presentes no leite, na gema de ovo e nos açúcares (AMANN e PICKETT, 1987).

Os crioprotetores penetrantes podem mover-se através das membranas e modular a taxa de desidratação celular durante a fase de transições das membranas induzidas pela congelação. Já os não penetrantes, incluindo açúcares e proteínas são utilizados para aumentar a temperatura de transição vítrea do diluente de congelação, preservando as estruturas celulares (SIEME et al., 2016). Além disso, os crioprotetores penetrantes substituem a água dentro da célula e os compostos inibem a formação de gelo intracelular (WU et al., 2015).

Segundo Pillet et al. (2011), a presença da gema de ovo de galinha ou fosfolipídios é essencial no diluente de congelação, sendo importante para a viabilidade dos espermatozoides pós-congelação. Assim, essas substâncias são utilizadas rotineiramente com sucesso como agentes protetores, para aumentar a resistência espermática ao choque térmico em sêmen de muitos animais domésticos ou selvagens.

Contudo, a gema de ovo possui três desvantagens no uso dos diluentes de congelação que requerem atenção, sendo elas: 1) Ser um componente de

origem animal e representar um risco de contaminação por bactérias em doses de inseminação artificial (BOSSEAU et al., 1998); 2) Não ser prática por conter material granular do mesmo tamanho dos espermatozoides, o que pode interferir nas observações microscópicas, além de não vir pronta, precisando ser retirada através da quebra do ovo manualmente; 3) É um produto extremamente complexo, possui composição bastante variável, pode apresentar diferença entre lotes e sua composição lipídica também pode mudar de acordo com a dieta das aves (PILLET et al., 2011).

A criopreservação requer uso de crioprotetores que tenham o mínimo de efeitos tóxicos (DAVIDSON et al., 2014). Sendo assim, tem se buscado crioprotetores alternativos para diminuir os efeitos tóxicos do glicerol, que é o crioprotetor mais utilizado em garanhões. Essa substituição pode ser de forma parcial ou completa no diluente de congelação (SIEME et al., 2016).

2.4.1. Dimetilformamida

Experimentos realizados para comparação de crioprotetores na congelação de sêmen de garanhão tem mostrado que as amidas são crioprotetores eficientes. Alvarenga et al. (2003) constataram que a dimetilformamida melhorou significativamente a motilidade espermática total e progressiva de espermatozoides de garanhões da raça Mangalarga, sendo uma raça que é conhecida por apresentar garanhões classificados como “mal congeladores” com uso de glicerol.

Squires et al. (2004) utilizaram a dimetilformamida como crioprotetor alternativo na congelação de sêmen equino, obtendo resultados satisfatórios de 48-54% de células móveis pós-congelação, semelhante ao glicerol que obteve 52%. Outros estudos mostram que a dimetilformamida ao ser utilizada nas concentrações de 2,5-5% tem efeito significativo na melhoria de vários parâmetros seminais, tanto de espermatozoides do ejaculado quanto do epidídimo (ALVAREZ et al., 2014).

A dimetilformamida como agente crioprotetor, combinado com o INRA96®, é uma alternativa para melhorar a mobilidade, integridade de membrana e a viabilidade, considerando que o glicerol pode determinar efeito tóxico aos espermatozoides (AMANN e PICKETT, 1987; SALAZAR et al., 2011).

Nascimento et al. (2015) constataram também a boa ação da dimetilformamida, quando combinada com glicerol em concentrações de 1 ou 2%, resultando em melhores resultados pós-descongelção, quando comparado ao diluidor contendo apenas glicerol a 5%. No caso, para o diluente no qual se utilizou somente o glicerol, as variáveis foram inferiores em todas as avaliações. Para os diluentes contendo combinação de amidas com glicerol não houve diferença nas variáveis de motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática e acrossomal em relação aos outros grupos experimentais.

2.4.2 Sacarose

A sacarose é um dissacarídeo, ou seja, um composto formado por dois monossacarídeos, sendo uma molécula de frutose e uma molécula de glicose (MANHANI et al., 2014). Por suas características de crioprotetor não penetrante, a sacarose pode causar efeitos significativos na criopreservação de sêmen, conseguindo alterar a fase de membrana e o comportamento da permeabilidade celular em temperaturas abaixo de 0 °C (OLDENHOF et al., 2013). A sacarose tem o poder de aumentar esse coeficiente de permeabilidade, implicando em uma taxa inicial de desidratação mais lenta, fazendo com que a mudança de fase seja mais gradual (SIEME et al., 2015).

A sacarose, como um açúcar, tem o papel de manter a pressão osmótica dos diluentes induzindo a desidratação celular e a menor formação de cristais de gelo nos espermatozoides (PURDY, 2006). O açúcar, além de poder formar uma película protetora agindo na temperatura da fase de transição da membrana, pode interagir com os fosfolípidios das membranas em baixa

hidratação, provocando a estabilização das membranas (HINCHA et al., 2006). A sacarose, assim como a trealose, sendo ambos dissacarídeos, pode interagir com os grupos de fosfolípidios polares durante a congelação e descongelação, reduzindo as forças de Van Der Waals (devido à interação eletrostática de íons, atuando quando uma molécula está muito perto da outra) entre as cadeias de hidrocarbonetos (AISEN et al., 2002).

Segundo De Leeuw et al. (1993), os açúcares, ao substituírem as ligações das moléculas de água com os fosfolípidios, previnem o dano às membranas, causado por desidratação extrema. E, além disso, através deste mecanismo, os açúcares podem aumentar o espaçamento entre os grupos cabeça polares dos fosfolípidios, diminuindo, assim, as interações de Van der Waals entre as cadeias de acil de fosfolípidios, causando, conseqüentemente, diminuição na temperatura de transição de fosfolípidios. Geralmente, os dissacarídeos são mais eficientes que os monossacarídeos na prevenção da desestabilização da bicamada lipídica durante o processo de congelação-descongelação (DE LEEUW et al. (1993).

Laffaldano et al. (2014), ao usarem sêmen congelado tratado com sacarose, fresco ou suplementado com lipoproteínas de baixa densidade da gema de ovo, na inseminação de coelhas, obtiveram bom resultado com as fêmeas inseminadas com sêmen congelado tratado com sacarose, tendo desempenho reprodutivo semelhante àquele observado com sêmen fresco, comprovando ser um bom crioprotetor não permeável.

El Sheshtawy et al. (2015) testaram diferentes concentrações de trealose e sacarose em diluente para sêmen de touro e constataram que a sacarose usada em concentrações de 50-100mM causou efeitos benéficos na congelação-descongelação, melhorando a motilidade, integridade de membrana e acrossoma dos espermatozoides pós-descongelação.

Na criopreservação de espermatozoides humanos, Liu et al. (2016), ao utilizarem diluentes com crioprotetores diferentes, observaram que tanto a trealose quanto a sacarose foram mais eficazes em relação a outros crioprotetores utilizados como tratamento, recuperando 69% e 68,9% da motilidade dos espermatozoides, respectivamente.

Desde então, a sacarose tem se mostrado uma alternativa de crioprotetor não penetrante eficiente na congelação de sêmen de espécies diferentes, mas ainda há a necessidade de se aprofundar para saber mais detalhes sobre seu mecanismo de ação nas células espermáticas.

2.5 Métodos de avaliação espermática

Na rotina, a análise do sêmen inclui concentração espermática, volume, morfologia e motilidade espermática. Porém, essas análises são subjetivas e imprecisas, necessitando de melhores formas de investigar a cinética e as mudanças na estrutura do espermatozoide, antes e após a congelação. Dentre os métodos de avaliação mais avançados pode-se destacar os que possuem análise computadorizada, como o sistema computadorizado de análise da cinética espermática (CASA) e a citometria de fluxo.

2.5.1 Sistema computadorizado de análise espermática (CASA)

A análise computadorizada da cinética espermática (CASA) foi introduzida há cerca de duas décadas, usando um microscópio combinado com uma câmera, no qual os espermatozoides são visualizados e reconhecidos de acordo com as configurações do software, produzindo dados precisos e repetitivos com diferentes parâmetros da cinética dos espermatozoides, podendo ser usado em espécies diferentes (HOOGEWIJS et al., 2011). O CASA é um sistema automatizado (Software e Hardware) para visualizar e digitalizar imagens sucessivas, analisando e fornecendo informações precisas da cinética individual dos espermatozoides (AMANN e KATZ, 2004). A avaliação automatizada da motilidade dos espermatozoides é de relevante interesse, tendo a cinética espermática sua devida importância na determinação do potencial de fertilidade dos espermatozoides (CELEGHINI et al., 2008).

Os parâmetros de cinética obtidos pelo CASA são: Motilidade total (%), população de células que se movem em uma velocidade mínima; Motilidade progressiva (%), que é a percentagem de células que se movem progressivamente; Velocidade média do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$); Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade média percorrida do início ao fim do trajeto em linha reta; Velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), que é a velocidade calculada de ponto a ponto do trajeto percorrido; Frequência de batimentos (BCF, Hz), que é a frequência com que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento; Amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH, μm), largura média da oscilação da cabeça no movimento da célula; Retilinearidade (STR, %), que é o valor médio da proporção VSL/ VAP; Linearidade (LIN, %), valor médio de VSL/VCL; e Velocidade rápida (%) (ARRUDA, 2011).

2.5.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo pode ser utilizada para o estudo do sêmen de várias espécies em diversas áreas, como na andrologia clínica, para avaliar o potencial de fertilidade; na toxicologia reprodutiva, para estudar os efeitos de exposições terapêuticas, ambientais e ocupacionais; e na ciência veterinária, para seleção de gênero, fazendo triagem dos cromossomos X e Y (CORDELLI et al., 2005).

Nos últimos anos, tem se buscado a melhoria da qualidade das técnicas de avaliação de sêmen, sendo a citometria de fluxo uma análise que permite a observação das características das células espermáticas, como tamanho, forma e função. Essa análise é realizada com uso de um marcador fluorescente, fornecendo informações precisas e confiáveis, tais como integridade de membrana, integridade do acrossoma, atividade mitocondrial, peroxidação lipídica, estabilidade de membrana e danos ao DNA (NIZANSKI et al., 2012).

Para a realização dessas análises, os espermatozoides são corados e a quantidade de sonda fluorescente absorvida por cada célula é avaliada pelo citômetro, coletando informações individuais através de canais fechados, por onde passa um feixe de laser que faz com que as sondas fluorescentes que estão combinadas com os espermatozoides sejam refletidas, permitindo a avaliação de uma estrutura específica e sua função (GRAHAM, 2001).

A descoberta de uma variedade de fluorocromos e compostos conjugados às sondas fluorescentes possibilitou uma análise mais detalhada da qualidade do sêmen a nível bioquímico, estrutural e funcional. Assim, a análise realizada com auxílio de um microscópio de fluorescência, que avalia um número pequeno de espermatozoides é demorada, subjetiva e geralmente mede atributos dos espermatozoides de forma individual. Na citometria de fluxo, esses marcadores fluorescentes podem ser utilizados com rapidez e precisão, permitindo aferir parâmetros em larga escala (GILLAN et al., 2005).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISEN, E. G.; MEDINA, V. H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram sêmen frozen in diferent trehalose concentrations. **Theriogenology**, v.57, p. 1801- 1808, 2002.

ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V.P. Progresso científico em equideocultura na 1a década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 119-129, 2010.

ALVARENGA, M.A.; LEÃO, K.M.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. **Proceedings...**, Workshop on Transporting Gametes and Embryos, Havemeyer Foundation, p. 74-76, 2003.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. A.; NETO, C.R. Advances in Stallion Semen Cryopreservation. **Veterinary Clinics of North America: Equine practice**, v. 32, p. 521-530, 2016.

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

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 105-113, 2005.

ALVAREZ, C.; GIL, L.; GONZÁLEZ, N.; OLACIREQUI, M.; LUÑO, V. Equine sperm post-thaw evaluation after the addition of different cryoprotectants added to INRA 96® extender. **Criobiology**, v.69, p. 144-148, 2014.

ALLEN, W.R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 310-329, 2005.

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

AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 317-325, 2004.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 145-151, 2011.

AURICH, J.E. Artificial Insemination in Horses - More than a Century of Practice and Research. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 458-463, 2012.

BATTUT, B.; KEMPFER, A.; LEMASSON, N.; CHEVRIER, B.; CAMUGLI, S. Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. **Theriogenology**, v. 97, p. 186-200, 2017.

BLOMMAERT, D. FRANCK, T.; DONNAY, I.; LEJEUNE J.P.; DETILLEUX, J.; SERTEYN, D. Substitution of egg yolk by a cyclodextrin-cholesterol complex allows a reduction of the glycerol concentration into the freezing medium of equine sperm. **Criobiology**, v. 72, p. 27-32, 2016.

BOUSSEAU, S.; BRILLARD, J.P.; MARGUANT-LE GUIENNE, B.; GUERIN, B.; CAMUS, A.; LECHAT, M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. **Theriogenology**, v. 50, p. 699-706, 1998.

BROWN, D.A.; LONDON, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p. 17221-17224, 2000.

BÜYÜKLEBLEBICI, S.; TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N.; TASDEMIR, U. T.; EKEN, A.; BÜYÜKLEBLEBICI, O.; DURMAZ, E.; SARIÖZKAN, S.; ENDIRLIK, B. U. Comparing ethylene glycol with glycerol and with or without dithiothreitol

and sucrose for cryopreservation of bull semen in egg-yolk containing extenders. **Cryobiology**, v. 69, p. 74–78, 2014.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R. P; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P.H. M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p.119-131, 2008.

CORDELLI, E.; ELEUTERI, P.; LETER, G.; RESCIA, M.; SPAN, M.; Flow cytometry applications in the evaluation of sperm quality: semen analysis, sperm function and DNA integrity. **International Reproductive Health Journal Contraception**, v. 72, p. 273-279, 2005.

DAVIDSON, A.F., BENSON, J.D., HIGGINS, A.Z. Mathematically optimized cryoprotectant equilibration procedures for cryopreservation of human oocytes. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 11, p. 13, 2014.

DE LEEW, F. E.; DE LEEW, A. M.; DEN DAAS, H. G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. Effects of various cryoprotective agents and membrane stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v. 30, p. 32-44, 1993.

EL-SHESTAWY, R.I.; SISY, G.A.; EL-NATTAT, W. Effects of different concentrations of sucrose or trehalose on the pos-thawing quality of cattle bull semen. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 4, p. 26-31, 2015.

FERREIRA, H. N. **Efeito da exposição aos crioprotetores glicerol e metilformamida sobre a viabilidade e fertilidade do sêmen equino**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), UNESP, Botucatu, São Paulo, 2008.

FERRIS, R.A., HATZEL, J.N.; LINDHOLM, A.R.G.; SCOFIELD, D.B.; MCCUE, P.M. Efficacy of Deslorelin Acetate (SucroMate) on Induction of Ovulation in American Quarter Horse Mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, V. 32, p. 285-288, 2012.

FÜRST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen**

equino. 96 f. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C.; Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-457, 2005.

GOUSSET, K.; WOLKERS, W.F.; TSVETKOVA, N.M.; OLIVER, A.E.; FIELD, C.L.; WALKER, N.J.; CROWE, J.H.; TABLIN, F. Evidence for a physiological role for membrane rafts in human platelets. **Journal of cellular Physiology**, v.190, p. 117-128, 2002.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 239-247, 2001.

HINCHA, D.K.; POPOVA, A.V.; CACELA, C. Effects of sugars on the stability and structure of Lipid membranes during drying, **Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes** , p. 127-189, 2006.

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

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

HOOGEWIJS, M.; DE VliegHER, S. C.; DE SCHAUWER, J; GOVAERE, J.; SMITS,K.; HOFACK, G.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Validation and usefulness of the Sperm Quality Analyzer V equine for equine semen analysis, **Theriogenology**, v. 75, p. 189-194, 2011.

JASKO, D.P. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, v. 10, p. 156-165, 1994.

LAFFALDANO, N.; DI LORIO, M.; ROSATO, M.P.; MANCHISI, A. Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: Effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from

egg yolk versus egg yolk or sucrose. **Animal Reproduction Science**, v. 151, p. 220-228, 2014.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. **Coletânea de Estudos Gleba**, nº 39, Piracicaba: ESALQ/USP, 66 p., 2006.

LIU, J.; TANRIKUT, C.; WRIGHT, D.L.; LEE, G.Y.; TONER, M.; BIGGERS, J.D.; TOTH, T.L. Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 73, p. 162-167, 2016.

LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. **Veterinary Clinics North American Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 663-676, 2006.

LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; LOWRY, V.K.; VARNER, D.D. The relationship between chromatin quality and fertility of chilled semen. **Proceedings American Association equine Practitioners**, v. 47, p. 229-231, 2001.

MANHANI, T.M.; CAMPOS, M.V.M.; DONATI, F.P. Sacarose, suas propriedades e os novos edulcorantes. **Revista Uniara**, v. 17, n. 1, p. 113-125, 2014.

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

MAZUR, P. Principles of cryobiology. Life in the Frozen State, CRC Press LLC, In: Lane NL, Benson EE, Fuller BJ (edição), Boca Raton, FL, p. 3–65, 2004.

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides equinos criopreservados**. Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 107 p., Pirassununga. 2006.

NASCIMENTO, J.; BLUME, H.; OLIVEIRA, F.J.G.; OLIVEIRA, R.A. Utilização de diferentes diluentes na criopreservação de espermatozoides de Mangalarga Marchador. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 324-30, 2015.

NIZANSKI, W.; PARTYKA, A.; RIJSSELAERE, T. Use of Fluorescent Stainings and Flow Cytometry for Canine Semen Assessment. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 215-221, 2012.

OLACIREQUI, M.; GIL, L.; MONTÓN, A.; LUÑO, V.; JEREZ, R. A.; MARTÍ, J.I. Cryopreservation of epididimal stallion sperm. **Criobiology**, v. 68, p. 91-95, 2014.

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

OLDENHOF, H.; GOJOWSKY, M.; WANG, S.; HENKE, S.; YU, C.; ROHN, K.; WOLKERS, W.F.; SIEME, H. Osmotic Stress and Membrane Phase Changes During Freezing of Stallion Sperm: Mode of Action of Cryoprotective Agents. **Biology of Reproduction**, v. 88, p. 1-11, 2013.

PIASSI, L.M.; CORCINI, C.D.; PANZARDI, A.; VARELA JUNIOR, A.S.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, J.C. Efeito de crioprotetores impermeáveis sobre a viabilidade in vitro de espermatozoides congelados de camundongos (*Mus musculus*) das linhagens Swiss-albina e Balb/c. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1161-1170, 2009.

PILLET, E.; DUCHAMP, G.; BATELLIER, F.; BEAUMAL, V.; ANTON, M.; DESHERCES, S.; SCHIMITT, E.; MAGISTRINI, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v. 75, p. 105-114, 2011.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.

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

FERRIS, R. A.; HATZEL, J.N.; LINDHOLM, A. R. G.; SCOFIELD, D. B. MCCUE, P.M. Efficacy of Deslorelin Acetate (SucroMate) on Induction of Ovulation in American Quarter Horse Mares, **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.285-288, 2012.

SAMPER, J.C; PYCOCK, J.F; ESTRADA, A. Evaluation of the stallion for artificial insemination with cooled shipped semen. **Equine Veterinary Education**, v. 16, n. 3, p. 144-149, 2004.

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

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

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J. K.; Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62 , p. 1056–1065, 2004.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J. Cooled and frozen Stallion Semen. Fort Collins: Colorado State University. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, **Bulletin**, n. 9, 80 p, 1999.

VIZUETE, G.; JIMÉNEZ, E. ; AGUERA, E. I.; PÉREZ-MARÍN, C. C. Impact of Ultra-Rapid Freezing on the Motility, Morphology, Viability and Acrosome Integrity of Epididymal Cat Sperm Diluted in Sucrose-Based Extenders. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 5-8, 2014.

WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; ENGEL, B. Effects of Trehalose and Sucrose, Osmolality of the Freezing Medium, and Cooling Rate on Viability and Intactness of Bull Sperm after Freezing and Thawing. **Cryobiology**, v. 35, p. 93–105, 1997.

WU, Z.; ZHENG, X.; LUO, Y.; HUO, F.; DONG, H.; ZHANG, G.; YU, W.; TIAN, F.; HE, L.; CHEN, J. Cryopreservation of stallion spermatozoa using different

cryoprotectants and combinations of cryoprotectants. **Animal Reproduction Science**, v. 163, p. 75-81, 2015.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on the motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, p. 579-585, 2000.

4 ARTIGO

**Uso de sacarose como suplemento em diluidor para congelamento
de sêmen de garanhões**

1 *Use of sucrose as a supplement in extender for freezing semen from stallions*

2 T.C.M. Moura^a, R.A.J. Araújo Silva^a, L.C.P. Arruda^a, R.P.F. Silva^b, J.C.
3 Gonzalez^a, A.M. Batista^a, M.M.P. Guerra^a

4 ^a*Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina*
5 *Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Dois*
6 *Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil*

7 ^b*Laboratório de Enzimologia (LABENZ), Departamento de Bioquímica,*
8 *Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420 Cidade Universitária, Recife,*
9 *Pernambuco, Brasil*

10

11

12

13

14 ***Autor para correspondência:** Maria Madalena Pessoa Guerra,
15 Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE, Rua Dom Manuel de
16 medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE. CEP: 52171-900, Brasil. Tel: +55 81
17 3320 6412, Fax: 3320 6057. E-mail: mmpguerra@pq.cnpq.br e
18 madalena.guerra@ufrpe.br

19

20

21

22

23

Resumo

24

25

26 O objetivo do estudo foi investigar os efeitos de diferentes concentrações de
27 sacarose sobre a qualidade do sêmen equino pós-descongelamento. Foram
28 utilizados 24 ejaculados obtidos de 6 garanhões da raça Mangalarga
29 Marchador e Campolina, no qual, cada ejaculado foi dividido em 5 grupos:
30 controle (diluidor de congelamento sem sacarose), controle positivo (Botucrio[®]) e
31 três grupos constituídos do diluidor de congelamento suplementados com
32 Sacarose nas concentrações de 25 mM, 50 mM e 100 mM. As amostras de
33 sêmen foram obtidas com vagina artificial, avaliadas, diluídas e transportadas
34 (5 °C) para o laboratório. As amostras de sêmen foram diluídas (200×10^6
35 espermatozoides/mL), envasadas em palhetas de 0,5 ml e submetidas à
36 congelamento. Imediatamente após descongelamento (37 °C, 30s), as amostras de
37 sêmen foram avaliadas quanto a cinética, integridade das membranas
38 plasmática e acrossomal, estabilidade de membrana e potencial de membrana
39 mitocondrial. A adição de 50 e 100 mM de sacarose ao diluidor de congelamento
40 aumentou ($P < 0,05$) os parâmetros de MT, MP, VCL, VSL e VAP, em relação
41 ao grupo controle sem tratamento. O parâmetro WOB do grupo suplementado
42 com sacarose na concentração de 100 mM foi maior ($P < 0,05$) do que o grupo
43 controle. Maiores valores ($P < 0,05$) de ALH e BCF foram observados nos
44 grupos tratados com sacarose (25, 50 e 100 mM), em comparação ao
45 Botucrio[®]. O sêmen congelado na presença de 100 mM de sacarose
46 apresentou porcentagens maiores ($P < 0,05$) de espermatozoides com
47 membranas plasmática e acrossomal intactas, e alto potencial de membrana
48 mitocondrial em relação aos outros grupos. Conclui-se que a adição de
49 sacarose nas concentrações de 50 e 100 mM como suplemento ao diluidor
50 base é um eficiente crioprotetor para congelamento de sêmen equino.

51 **Palavras-chave:** Citometria de fluxo, crioprotetor, criopreservação, sacarose,
52 sêmen equino.

53

54

55

Abstract

56

57 *The objective of the study was to investigate the effects of different*
58 *concentrations of sucrose on equine semen quality after thawing. Twenty-four*
59 *ejaculates obtained from 6 Mangalarga Marchador and Campolina stallions*
60 *were used, in which each ejaculate was divided into five groups: control*
61 *(freezing diluent without sucrose), positive control (Botucurio®) and three groups*
62 *consisting of the freezing diluent supplemented with Sucrose at concentrations*
63 *of 25 mM, 50 mM and 100 mM. The semen samples were obtained with*
64 *artificial vagina, evaluated, diluted and transported (5 °C) to the laboratory. The*
65 *semen samples were diluted (200x10⁶ sperm / mL), filled in 0.5 ml vanes and*
66 *subjected to freezing. Immediately after thawing (37 ° C, 30s), the semen*
67 *samples were evaluated for kinetics, plasma and acrosomal membrane*
68 *integrity, membrane stability and mitochondrial membrane potential. The*
69 *addition of 50 and 100 mM sucrose to the freezing diluent increased (P <0.05)*
70 *the MT, MP, VCL, VSL and VAP parameters in relation to the control group*
71 *without treatment. The WOB parameter of the group supplemented with 100*
72 *mM sucrose concentration was higher (P <0.05) than the control group. Higher*
73 *values (P <0.05) of HLA and BCF were observed in the sucrose-treated groups*
74 *(25, 50 and 100 mM) compared to Botucurio®. Frozen semen in the presence of*
75 *100 mM sucrose had higher percentages (P <0.05) of spermatozoa with intact*
76 *plasma and acrosomal membranes, and high mitochondrial membrane potential*
77 *in relation to the other groups. It is concluded that the addition of sucrose at*
78 *concentrations of 50 and 100 mM as a supplement to the base diluent is an*
79 *efficient cryoprotectant for freezing equine semen.*

80 **Key words:** *Flow cytometry, cryoprotectant, cryopreservation, sucrose, equine*
81 *semen.*

82

83 **1. Introdução**

84 A criopreservação de sêmen é uma das biotecnologias que possibilitam
85 vantagens na reprodução da espécie equina, tendo como principais benefícios
86 a diminuição de custos e riscos dos transportes dos animais que se deseja
87 reproduzir, o controle de doenças, o transporte de sêmen de animais
88 geneticamente superiores e o uso do sêmen de animais que estão em alguma
89 atividade esportiva ou que já morreram. Porém, o espermatozoide equino
90 apresenta baixa resistência ao processo de criopreservação, refletindo
91 diretamente em baixas taxas de fertilidade do sêmen congelado-descongelado
92 (FERREIRA, 2008).

93 Segundo Holt (2000), açúcares usados como crioprotetores não-
94 penetrantes agem minimizando o estresse osmótico durante a congelação,
95 mantendo a pressão osmótica do diluidor induzindo a desidratação celular e
96 evitando maiores formações de cristais de gelo (PURDY, 2006) e
97 desempenhando um importante papel no diluidor de congelação. Além de
98 atuarem como crioprotetores, os açúcares podem agir como substratos
99 energéticos e protetores da membrana plasmática durante a congelação e
100 descongelação, através de interações diretas com a membrana dos
101 espermatozoides (YILDIZ et al., 2000).

102 A sacarose pode fazer um ótimo papel na criopreservação de sêmen,
103 sendo utilizada e comprovada na congelação de sêmen de touros
104 (WOELDERS et al., 1997; BÜYÜKLEBLEBICI et al., 2014), cães (YILDIZ et al.,

105 2000), gatos (VIZUETE et al., 2014), coelhos (LAFFALDANO et al., 2014) e
106 cavalos (OLDENHOF et al., 2013), no qual houve um estudo sobre a ação de
107 diferentes crioprotetores analisando a permeabilidade e a fase de membrana
108 em temperatura abaixo de 0° C, sendo um deles a sacarose. No entanto, ainda
109 é necessário conhecer melhor a ação da sacarose nos espermatozoides,
110 através da análise de seus efeitos de interação na criopreservação de sêmen
111 equino, somando aos dados obtidos por Oldenhof et al. (2013) . O objetivo
112 deste estudo foi investigar os efeitos da adição de sacarose e agregar mais
113 informações, em diferentes concentrações, ao diluidor de criopreservação de
114 sêmen equino sobre a qualidade dos espermatozoides pós-descongelção.

115

116 **2. Material e Métodos**

117

118 Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação pelo Comitê
119 de Ética no Uso dos Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco
120 (CEUA-UFRPE), licença nº 093/2016 CEUA/UFRPE.

121

122 *2.1. Reagentes e diluidores*

123

124 Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO,
125 USA), exceto os especificados. O diluidor base foi constituído de 5% de leite
126 desnatado, 25g/L de glicose, 0,25 g/L de citrato de sódio, 4,76 g/L de HEPES,
127 3,5 mL de piruvato e 0,5 mg de antibiótico (pentabiótico, Fort Dodge®), com pH
128 7,0. Para congelação, utilizou-se o diluidor base acrescido de 20% de gema de
129 ovo e dimetilformamida a 4%. Para os grupos experimentais, foram realizadas

130 suplementações ao diluidor de congelação com sacarose nas concentrações
131 de 25mM, 50mM e 100mM. Também, foi utilizado o diluente de congelação
132 Botucrio[®] (Botupharma, Botucatu-SP) como controle positivo, o qual não foi
133 exposto ao tratamento experimental, por já se conhecer o seu efeito.

134

135

136

137 *2.2. Animais*

138

139 Foram utilizados 6 garanhões das raças Mangalarga Marchador (n=5) e
140 Campolina (n=1), com idade entre 4 e 8 anos, oriundos de três haras situados
141 na Zona da Mata do Estado de Pernambuco: (7° 75' 40" S, 35° 0' 22" W).-As
142 amostras de sêmen foram obtidas no período de setembro a dezembro de
143 2016. Todos os animais foram mantidos em baias individuais, com livre acesso
144 à água, sendo oferecido concentrado e feno, levando em consideração que
145 cada haras mantém seu regime de manejo e nutrição.

146

147 *2.3. Colheita e Avaliação do sêmen*

148

149 As amostras de sêmen foram obtidas utilizando vagina artificial (modelo
150 Botucatu). Foram coletados 4 ejaculados de cada garanhão, colhidos duas
151 vezes por semana, totalizando 24 ejaculados. Após a colheita e remoção da
152 fração gel (através do filtro contido no copo coletor da vagina artificial), as
153 amostras foram submetidas a avaliações macroscópica (volume, aspecto, cor)
154 e microscópica (motilidade e vigor). Foram utilizados apenas os ejaculados que

155 apresentavam motilidade $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 , seguindo os padrões mínimos
156 recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).
157 Após estas etapas, o sêmen foi diluído em meio de transporte, tendo como
158 base o INRA 82 modificado (1:1), foi acondicionado em caixa isotérmica e
159 transportado em condições refrigeradas a 5 °C para o Laboratório de
160 Andrologia do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal
161 Rural de Pernambuco (Androlab – UFRPE), onde foram avaliados os
162 parâmetros cinéticos, com auxílio do Sistema Computadorizado de Análise
163 Espermática (CASA; SCATM, Microptics, S.L., Version 5.1, Barcelona,
164 Espanha). A concentração espermática foi determinada em Câmara de
165 Neubauer, após diluição do sêmen puro em solução de formol salina (1:20), em
166 microscópio de contraste de fase (Olympus, Tokyo, Japan; 100 X).

167

168 *2.4. Formação dos grupos e congelação do sêmen*

169

170 Após aprovação dos parâmetros, as amostras de sêmen foram divididas
171 em tubos de ensaio (15 mL) e submetidas à centrifugação a 600 x g por 10
172 minutos, para retirada do plasma seminal. O sobrenadante foi desprezado e o
173 *pellet* utilizado para formação de cinco grupos experimentais: Controle (sem
174 adição de sacarose), controle positivo (Botucrio[®]) e três grupos tratados com
175 sacarose (25, 50 e 100mM), na concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL.

176 A seguir, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas (0,5 mL),
177 previamente identificadas e submetidas à congelação em máquina (TK3000[®],
178 TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, MG, Brasil), utilizando a
179 seguinte curva de criopreservação: -0,5 °C/min até atingir 5 °C, seguida por

180 estabilização de 30 minutos; curva de congelação de -15 °C /min até atingir a
181 temperatura de -120 °C, seguida pela imersão em nitrogênio líquido e
182 armazenamento em botijões criogênicos a -196 °C.

183

184

185 *2.5. Descongelação e análise das amostras*

186

187 As palhetas foram descongeladas em banho-maria (37 °C/ 30s) e
188 realizada a avaliação de cinética, integridade das membranas plasmática e
189 acrossomal, estabilidade de membrana e potencial de membrana mitocondrial.

190

191 *2.5.1. Cinética espermática*

192

193 A cinética espermática foi avaliada no CASA, utilizando as seguintes
194 configurações: magnificação 100 x; número de imagens por segundo 24; área
195 de cabeça 10 a 70 μm^2 ; VAP; lento 10 $\mu\text{m/s}$ < médios 45 $\mu\text{m/s}$ < rápidos 90
196 $\mu\text{m/s}$; progressividade 75% STR; circular 50% LIN. Alíquotas de cada amostra
197 (5,0 μL) de sêmen descongelado, foram avaliadas individualmente sobre
198 lâmina coberta com lamínula (18 x 18 mm), pré-aquecidas a 37 °C e
199 examinadas em microscópio de contraste de fase, com objetiva de 10x,
200 acoplado ao sistema CASA. Foram capturados pelo menos 500
201 espermatozoides por amostra, em cinco campos aleatórios não consecutivos,
202 selecionados pelo mesmo operador. Dentre os parâmetros fornecidos pelo
203 programa, foram consideradas as seguintes variáveis: motilidade total (MT, %),
204 motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade

205 em linha reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade média da trajetória (VAP, $\mu\text{m/s}$),
206 retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %), amplitude lateral da cabeça
207 (ALH, μm), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF, Hz) e índice de
208 oscilação (WOB, %).

209

210 *2.5.2. Citometria de fluxo*

211

212 As avaliações de citometria de fluxo foram realizadas utilizando o
213 Citômetro Amnis[®] ImageStream^X Mark II (EMD Millipore Corp.), equipado com
214 microscópio com objetiva de 60x, com taxa de imagem de 5000 células/seg.
215 Um laser de excitação de 488 nm foi utilizado e foram colhidos,
216 aproximadamente, 5000 eventos por amostra.

217 O tamanho das células e a velocidade do fluxo foi de 7,0 μm e 44
218 mm/seg, respectivamente. A aquisição das imagens brutas foi realizada através
219 do software INSPIRE[®] e as análises das mesmas através do software IDEAS[®]
220 (versão 6.0).

221 Uma alíquota (50 μL) de sêmen descongelado foi acrescida de 1 mL de
222 PBS (Fosfato Salino Tamponado), pH 7,2 e 300-400 mOsm/L, e submetida a
223 centrifugação (500 x g/ 5 m). Após essa etapa, o sobrenadante foi removido e o
224 *pellet* ressuspenso em 40 μL de PBS.

225

226 *2.5.2.1. Integridade das membranas plasmática e Acrossomal*

227

228 Para análise da integridade das membranas plasmáticas e acrossomal
229 (iPAM), foi utilizada a associação de fluorocromos composta por *Peanut*

230 *agglutinin* (FITC-PNA) e iodeto de propídio (IP). A solução de trabalho de PNA
231 foi formulada a 0,04 mg/mL em PBS, e a solução de IP, a 0,1 mg/mL de PBS.
232 Foram adicionados à amostra 5 µL de PNA e 5 µL de IP, seguido da adição de
233 5 µL de paraformaldeído a 4% e incubação por 5 minutos a temperatura
234 ambiente.

235 Os espermatozoides foram classificados como portadores de
236 membranas plasmática e acrossomal íntegras (IP-/PNA-), membranas
237 plasmática íntegra e acrossomal danificada (IP-/PNA+; Figura 1), membranas
238 plasmática danificada e acrossomal íntegra (IP+/PNA-) e membranas
239 plasmática e acrossomal danificadas (IP+/PNA+; Figura 2). O fluorocromo
240 FITC-PNA foi detectado pelo canal 2 (505-560nm) e IP no canal 5 (642-745
241 nm) (Figura 3).

242

243 *2.5.2.2. Estabilidade de Membrana*

244

245 A avaliação da estabilidade de membrana plasmática dos
246 espermatozoides foi realizada usando uma associação de fluorocromos,
247 compostas por Merocianina 540 (M540), corante específico para detecção da
248 desorganização lipídica da membrana, e Yo-Pro-1 (YP), que possui afinidade
249 pelo DNA, sendo um corante impermeável, incapaz de passar pela membrana,
250 atravessando somente quando a membrana do espermatozoide está
251 danificada. A solução de trabalho de M540 foi formulada a 270 µM em PBS, e a
252 solução de YO-PRO-1 a 2,5 µM em PBS. Foram adicionados 5 µL de YO-PRO-
253 1, homogeneizado e incubado a 37 °C por 15 minutos. Após essa etapa, foram

254 adicionados 5µL de M540 e paraformaldeído a 4%, seguido de incubação à
255 temperatura ambiente por 5 minutos e avaliação.

256 Os espermatozoides foram classificados nas seguintes categorias:
257 viáveis com membrana estabilizada (YP-/M540-); viáveis com membrana
258 plasmática desestabilizada (YP-/M540+); não viáveis com membrana
259 estabilizada (YP+/M540-); e não viáveis com membrana desestabilizada
260 (YP+/M540+). O fluorocromo YP foi detectado pelo canal 2 (505-560nm) e a
261 M540 pelo canal 3 (560-595 nm).

262

263 2.5.2.3. *Potencial Mitocondrial*

264

265 Para análise do potencial de membrana mitocondrial, foi utilizado o
266 fluorocromo catiônico lipofílico: Iodeto de 5,5',6,6'-tetrachloro-1,10,3,30-
267 tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1). A solução de trabalho de JC-1 foi
268 formulada a 306 nM em DMSO. Foram adicionados 5 µL de JC-1, seguido de
269 homogeneização e incubação a temperatura ambiente (5 minutos) e posterior
270 análise.

271 As células coradas em laranja, detectadas pelo canal 4 (595-642 nm) na
272 peça intermediária, foram classificadas como detentoras de alto potencial de
273 membrana mitocondrial (Figura 4), enquanto aquelas coradas em verde,
274 detectadas pelo canal 2 (505-560nm), foram classificadas como portadoras de
275 baixo potencial de membrana (Figura 5).

276

277

278

279 2.6. Análise Estatística

280

281 As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad
282 InStat (versão 3.10, 2009). Os dados das variáveis estudadas foram testados
283 para normalidade e homogeneidade da variância, usando o teste Kolmogorov-
284 Smirnov e Bartlett's test, respectivamente. As variáveis expressas em
285 porcentagem foram transformadas por arco seno (arco seno $\sqrt{P/100}$). A
286 influência dos diluentes sobre as variáveis de qualidade seminal foram testadas
287 por análise de variância (ANOVA) para as repetições, seguidas pelo teste de
288 comparação múltipla de Tukey-Kramer. Os resultados foram expressos como
289 média \pm desvio padrão da média e as diferenças foram consideradas
290 significativas quando $P < 0,05$.

291

292 3. Resultados

293

294 Os dados apresentados na Tabela 1 mostram que a adição de 50 e
295 100 mM de sacarose ao diluidor de congelação aumentou ($P < 0,05$) os
296 parâmetros de MT, MP, VCL, VSL e VAP, em relação ao grupo controle. O
297 parâmetro WOB do grupo suplementado com sacarose na concentração de
298 100 mM foi maior ($P < 0,05$) do que o grupo controle. Os parâmetros de LIN,
299 STR, ALH e BCF não apresentaram diferença ($P > 0,05$) entre os grupos
300 controle e suplementados com sacarose nas concentrações de 25, 50 e 100
301 mM.

302 Ao comparar a cinética espermática dos grupos suplementados com
303 sacarose, em comparação ao do grupo Botucrio® (controle positivo), evidencia-

304 se menores ($P < 0,05$) percentuais de MT no grupo sacarose 25mM, e de MP,
305 LIN, STR, WOB, nos grupos suplementados com 25, 50 e 100 mM. Observa-
306 se também que o VCL, nos três grupos suplementados com sacarose (25, 50 e
307 100 mM), não diferiu ($P > 0,05$) do grupo Botucrio®, enquanto a VSL nos
308 grupos suplementados com sacarose nas concentrações de 25 e 50 mM foram
309 menores ($P < 0,05$) que o do Botucrio®. Além disso, constata-se menor valor
310 ($P < 0,05$) de VAP no grupo de 25 mM de sacarose, quando comparado ao
311 grupo Botucrio®. Maiores valores ($P < 0,05$) de ALH e BCF foram observados
312 nos grupos tratados com sacarose (25, 50 e 100 mM), em comparação ao
313 Botucrio®.

314 Como demonstrado na Tabela 2, o sêmen congelado na presença de
315 100 mM de sacarose apresentou porcentagens maiores ($P < 0,05$) de
316 espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal intactas (PNA-/IP-
317), e alto potencial de membrana mitocondrial (APMM), quando comparado com
318 o sêmen congelado sem sacarose (grupo controle), com Botucrio® (controle
319 positivo) ou na presença de 25 mM ou 50 mM de sacarose.

320 Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para o parâmetro de
321 estabilidade de membrana (M540-/Yo-Pro-1-) entre os grupos suplementados
322 com sacarose (25, 50 e 100mM), sem sacarose (controle) ou Botucrio®
323 (controle positivo).

324

325 **4. Discussão**

326

327 Neste estudo, foi demonstrado que a inclusão de sacarose, nas
328 concentrações de 50 e 100 mM, ao meio de criopreservação, conferiu

329 significativa melhora na motilidade total e progressiva dos espermatozoides
330 congelados de garanhões, assim como nas variáveis de VCL, VSL e VAP.
331 Além disso, a adição de 100 mM proporcionou significativo efeito crioprotetor
332 sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal e sobre o
333 potencial de membrana mitocondrial em comparação ao diluidor sem este
334 dissacarídeo após a criopreservação.

335 Os maiores valores observados em VCL, VSL e VAP podem estar
336 relacionados ao efeito crioprotetor da sacarose, aliada à dimetilformamida nas
337 células espermáticas, preservando sua função mitocondrial. Segundo Darr et
338 al. (2016), a motilidade dos espermatozoides depende da energia obtida do
339 metabolismo mitocondrial, e que o dano mitocondrial observado durante o
340 processo de criopreservação pode ser uma das principais causas na redução
341 da mobilidade dos espermatozoides. Assim, diminuindo a mobilidade dos
342 espermatozoides, certamente os parâmetros cinéticos de velocidade também
343 irão diminuir.

344 Percentagens semelhantes de motilidade total dos espermatozoides
345 foram obtidas com sêmen congelado em diluidor comercial (Botucrio®; controle
346 positivo), em relação àqueles suplementados com sacarose (50 e 100 mM).
347 Entretanto, os espermatozoides congelados em Botucrio® (controle positivo) ou
348 sem sacarose (controle) apresentaram menores percentuais de membranas
349 plasmática e acrossomal íntegras, assim como menor percentual de
350 espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial, quando
351 comparado ao diluidor acrescido de 100 mM de sacarose. Os resultados
352 obtidos neste experimento estão de acordo com estudos prévios, sobre o uso
353 de sacarose no meio de criopreservação, relatados em cães (YILDIZ et al.,

354 2000), no qual a sacarose e outros dissacarídeos reduziram a porcentagem de
355 acrossoma danificado e a taxa de espermatozoides mortos pós-descongelação.
356 Também em coelhos, LAFFALDANO et al. (2014) constataram um ótimo
357 desempenho da sacarose pós-descongelação, tendo um resultado equivalente
358 ao do sêmen fresco na taxa de fertilização. E touros (EL-SHESHTAWY et al.,
359 2015), no qual a sacarose a 50 e 100mM mostrou bons resultados pós-
360 descongelação. Além disso, Oldenhof et al. (2013) relataram que a adição de
361 sacarose (75 mM) ao diluidor comercial (INRA82) resultou em elevada
362 motilidade e membranas plasmática intactas, pós-descongelação, de
363 espermatozoides de garanhões.

364 A melhora na qualidade do sêmen pós-descongelação sob a adição da
365 sacarose ao diluidor, provavelmente foi devido à redução nas injúrias causadas
366 pela cristalização do gelo, uma vez que a sacarose torna o meio hipertônico,
367 diminuindo a água congelável intracelular (SIEME et al., 2015). A sacarose
368 aumenta a temperatura de transição vítrea do diluidor de congelação e a
369 diferença na capacidade térmica associada à transição vítrea. Como
370 consequência, é formada uma matriz vítrea mais estável, na qual as células
371 podem ser preservadas a temperaturas abaixo de zero (OLDENHOF et al.,
372 2013).

373 Estudos prévios demonstraram que a atividade mitocondrial de
374 espermatozoides equinos é susceptível aos danos induzidos pela
375 criopreservação (SCHOBER et al., 2007; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009)
376 e pelo choque osmótico (BALL e VO, 2001). Por outro lado, tem sido observado
377 que amostras congeladas de sêmen de garanhões em diluidores contendo
378 dimetilformamida, como crioprotetor permeável, apresentaram menor

379 percentagem de mitocôndrias com baixo potencial de membrana (MORILLO
380 RODRIGUEZ et al., 2012). No presente experimento, amostras congeladas em
381 diluidor contendo 100 mM de sacarose associado à 4% de dimetilformamida
382 apresentaram significativamente mais mitocôndrias com alto potencial de
383 membrana mitocondrial. Sugere-se, portanto, ter havido efeito associado dos
384 crioprotetores, promovendo, assim, redução do estresse osmótico e
385 favorecendo a manutenção da atividade mitocondrial.

386 O ensaio Merocianina 540 detecta espermatozoides com desordem dos
387 lípidos da membrana espermática (RATHI et al., 2001) e que o aumento na
388 fluorescência de merocianina tem sido relacionado com estágios iniciais de
389 capacitação (FLESCH et al., 2001). Nas condições do presente estudo, as
390 amostras de sêmen criopreservadas em diluidor contendo 100 mM de sacarose
391 tiveram percentagem reduzida de espermatozoides viáveis com membranas
392 desestabilizadas, mas não foi significativamente diferente dos demais grupos.

393 Provavelmente, esse resultado aconteceu devido à composição do
394 diluidor utilizar crioprotetores diferentes, que atuaram em conjunto, protegendo
395 as membranas dos espermatozoides e evitando uma maior desestabilização da
396 mesma.

397 A preservação da estabilidade da membrana pode ter ocorrido pela
398 adição da sacarose, devido à sua ação protetora na fase de transição vítrea,
399 estando de acordo com estudos feitos por Oldenhof et al. (2013), que permitiu
400 que a célula se adequasse ao meio em baixas temperaturas com menor gasto
401 de energia, dando mais tempo para a membrana se organizar no momento da
402 congelação. A sacarose, como um dissacarídeo, pode ter também o mesmo
403 poder da trealose, estando de acordo com estudos feitos por Aisen et al.

404 (2001), no qual o dissacarídeo faz interação com os fosfolipídios polares da
405 membrana durante o processo de congelação-descongelação, diminuindo as
406 forças de Van Der Waals entre as cadeias de hidrocarbonetos e ajudando a
407 manter a estabilidade de membrana.

408 Os resultados desse estudo também corroboram com os dados de
409 Fernández-Santos et al. (2007), ao comprovarem a influência da sacarose na
410 organização da membrana plasmática de espermatozoides obtidos do
411 epidídimo de *Cervus elaphus hispanicus*, demonstrando que manose, glicose,
412 maltose e sacarose melhoraram a estabilidade da membrana por interação
413 direta com fosfolipídios.

414 Da mesma forma, Gómes-Fernandez et al. (2012), ao compararem a
415 ação de diferentes monossacarídeos e dissacarídeos na qualidade do sêmen
416 criopreservado de suíno, observaram que dissacarídeos apresentando o
417 mesmo peso molecular, porém com composição diferente, tiveram efeitos
418 distintos na qualidade do sêmen pós-descongelação. Esse resultado evidencia
419 que a ação não é só pelo peso molecular, mas também por sua composição e
420 interação com a membrana plasmática através de grupos cabeça polar de
421 fosfolipídios (AISEN et al., 2002).

422 A interação entre os açúcares e as membranas pode explicar os
423 diferentes efeitos crioprotetores dos açúcares dependendo da espécie, uma
424 vez que a composição da membrana plasmática varia entre as espécies.
425 Assim, é provável que um açúcar seja mais apropriado para uso na congelação
426 do sêmen de uma espécie, devido à composição de sua membrana plasmática,
427 do que em outras (GÓMES-FERNÁNDEZ et al., 2012)..

428

429 **5. Conclusão**

430

431 A adição de sacarose, nas concentrações de 50 e 100 mM, ao diluidor à
432 base de leite/gema, utilizando dimetilformamida, pode ser um eficiente
433 crioprotetor para congelação de sêmen equino, em virtude de preservar a
434 motilidade, integridade das membranas plasmática e acrossomal, assim como
435 a atividade mitocondrial dos espermatozoides.

436

437 **6. Referências**

438

439 AISEN, E. G.; MEDINA, V. H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-
440 thawed fertility of ram sêmen frozen in diferent trehalose concentrations.
441 **Theriogenology**, v.57, p. 1801- 1808, 2002.

442

443 BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of
444 soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial
445 membrane potential. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 6, p. 1061–1069, 2001.

446

447 BÜYÜKLEBLEBICI, S.; TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N.; TASDEMIR, U. T.;
448 EKEN, A.; BÜYÜKLEBLEBICI, O.; DURMAZ , E.; SARIÖZKAN, S.; ENDIRLIK,
449 B. U. Comparing ethylene glycol with glycerol and with or without dithiothreitol
450 and sucrose for cryopreservation of bull semen in egg-yolk containing
451 extenders. **Cryobiology**, v. 69, p. 74–78, 2014.

452

453 CBRA (COLÉGIO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL). 2013. **Manual para**
454 **exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3a ed. Belo Horizonte:
455 CBRA.104.

456

457 DARR, C.R.; CORTOPASSI, G.A.; DATTA, S.; VARNER, D.D.; MEYERS, S.A.
458 Mitochondrial oxygen consumption is a unique indicator of stallion spermatozoal
459 health and varies with cryopreservation media. **Theriogenology**, v. 86, p. 1382-
460 1392, 2016.

461

462 EI-SHESHTAWY, R. L.; SISY, G. A.; EL-NATTAT, W.S. Effects of different
463 concentrations of sucrose or trehalose on the post thawing quality of cattle bull
464 semen. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 4, p. 26-31, 2015.

465

466 FERNANDEZ-SANTOS, M. R.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; GARCÍA-MACÍAS, V.;
467 ESTESO, M. C.; SOLER, A. J.; PAZ, P.; ANEL, L.; GARDE, J. J. Extender
468 osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the
469 cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal
470 spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, p. 738-756, 2007.

471

472 FERREIRA, H. N. **Efeito da exposição aos crioprotetores glicerol e**
473 **metilformamida sobre a viabilidade e fertilidade do sêmen equino**. Tese
474 (Mestrado em Reprodução Animal), UNESP, Botucatu, São Paulo, 2008.

475

476 FLESCH, F. M.; BROUWERS, J. F. H. M.; NIEVELSTEIN, P. F. E. M.;
477 VERKLEIJ, A. J.; VAN GOLDE, L. M. G.; COLENBRANDER, B.; GADELLA,

478 B.M. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol
479 redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma
480 membrane. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 3543-3555, 2001.

481

482 GÓMES-FERNANDEZ, J.; GÓMES-IZQUIERDO, E.; TOMÁS, C.; MOCÉ, E.;
483 MERCADO, E. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar
484 sperm quality after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 133,
485 p. 109-116, 2012.

486

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

489

490 LAFFALDANO, N.; DI LORIO, M.; ROSATO, M.P.; MANCHISI, A.
491 Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants:
492 Effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from
493 egg yolk versus egg yolk or sucrose. **Animal Reproduction Science**, v. 151,
494 p. 220-228, 2014.

495

496 MORILLO RODRIGUEZ, A.; MACÍAS GARCIA, B.; ORTEGA FERRUSOLA, C.;
497 APARICIO, I.M.; MIRÓ-MORAN, A.; GALLARDO BOLAÑOS, J.M.; GONZÁLEZ
498 FERNÁNDEZ, L.; BALAO DA SILVA, C.M.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.;
499 TAPIA, J.A. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on
500 membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial
501 membrane potential. **Theriogenology**, v. 77, p. 1280-1289, 2012.

502

- 503 .OLDENHOF, H.; GOJOWSKY, M.; WANG, S.; HENKE, S.; YU, C.; ROHN, K.;
504 WOLKERS, W.F.; SIEME, H. Osmotic Stress and Membrane Phase Changes
505 During Freezing of Stallion Sperm: Mode of Action of Cryoprotective Agents.
506 **Biology of Reproduction**, v. 88, p. 1-11, 2013.
- 507
- 508 ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GARCÍA, B.M.; GALLARDO-BOLAÑOS, J.M.;
509 GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.;
510 PEÑA, F.J. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of
511 stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 114, p. 393-403,
512 2009.
- 513
- 514 RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M.
515 Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of**
516 **Reproduction**, v. 5, p. 462-470, 2001.
- 517
- 518 SCHOBER, D; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. Influence of cryopreservation
519 on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p.
520 745-754, 2007.
- 521
- 522 SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W.F. Sperm membrane behaviour
523 during cooling and cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.
524 50, p. 20-26, 2015.
- 525
- 526 VIZUETE, G.; JIMÉNEZ, E. ; AGUERA, E. I.; PÉREZ-MARÍN, C. C. Impact of
527 Ultra-Rapid Freezing on the Motility, Morphology, Viability and Acrosome

528 Integrity of Epididymal Cat Sperm Diluted in Sucrose-Based Extenders.
529 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 5-8, 2014.

530

531 WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; ENGEL, B. Effects of Trehalose and Sucrose,
532 Osmolality of the Freezing Medium, and Cooling Rate on Viability and
533 Intactness of Bull Sperm after Freezing and Thawing. **Cryobiology**, v. 35,
534 p. 93–105, 1997.

535

536 YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar
537 supplementation of the extender on the motility, viability and acrossomal
538 integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, p. 579-
539 585, 2000.

540

Tabela 1. Parâmetros cinéticos avaliados pelo CASA. Sêmen criopreservado de equino com meio de congelação à base leite/gema, sem sacarose (controle), com Botucrio® (controle positivo) ou suplementado com Sacarose (25 mM, 50 mM e 100 mM). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão

Parâmetros	Botucrio®	Controle	25 mM	50 mM	100 mM
MT (%)	58,46 \pm 14,02 ^a	35,9 \pm 11,94 ^c	43,78 \pm 15,22 ^{bc}	49,67 \pm 19,04 ^{ab}	52,95 \pm 15,85 ^{ab}
MP (%)	42,17 \pm 7,19 ^a	22,06 \pm 4,49 ^d	28,58 \pm 5,98 ^{cd}	32,85 \pm 7,27 ^{bc}	35,30 \pm 8,41 ^b
LIN (%)	65,2 \pm 6,58 ^a	47,58 \pm 4,36 ^b	47,7 \pm 4,29 ^b	48,55 \pm 4,45 ^b	51,88 \pm 5,53 ^b
STR (%)	83,2 \pm 4,76 ^a	76,73 \pm 3,51 ^b	76,58 \pm 4,20 ^b	75,99 \pm 3,84 ^b	77,39 \pm 4,58 ^b
WOB (%)	77,86 \pm 3,99 ^a	61,9 \pm 3,42 ^c	62 \pm 2,81 ^c	63,56 \pm 2,89 ^c	66,77 \pm 3,66 ^b
VCL (μ m/s)	62,6 \pm 6,83 ^{ab}	52,8 \pm 9,30 ^b	60,51 \pm 11,09 ^{ab}	65,60 \pm 8,47 ^a	68,95 \pm 11,81 ^a
VSL (μ m/s)	40,78 \pm 6,97 ^a	25,10 \pm 4,86 ^c	28,71 \pm 6,67 ^{bc}	31,90 \pm 6,27 ^b	35,66 \pm 8,73 ^{ab}
VAP (μ m/s)	48,86 \pm 6,84 ^a	32,53 \pm 5,64 ^c	37,47 \pm 7,51 ^{bc}	41,71 \pm 6,70 ^{ab}	46,05 \pm 9,47 ^a
ALH (μ m)	2,30 \pm 0,23 ^b	2,80 \pm 0,65 ^a	3,09 \pm 0,24 ^a	3,14 \pm 0,19 ^a	3,03 \pm 0,18 ^a
BCF (Hz)	10,27 \pm 0,71 ^b	11,74 \pm 2,18 ^a	12,8 \pm 1,05 ^a	12,6 \pm 0,76 ^a	12,17 \pm 1,19 ^a

MT: Motilidade total, MP: motilidade progressiva, LIN: linearidade, STR: retilinearidade, WOB: índice de oscilação, VCL: velocidade curvilínea, VSL: velocidade em linha reta, VAP: velocidade média da trajetória, ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça, BFC: frequência de batimento cruzado. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ($P < 0,05$) entre os grupos.

Tabela 2. Integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e estabilidade de membrana mensurados por citometria de fluxo de espermatozoides equinos submetidos a congelação em diluente à base leite/gema, sem sacarose (controle), com Botucrio® (controle positivo) ou suplementado com Sacarose (25 mM, 50 mM e 100 mM). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão

Parâmetros	Botucrio®	Controle	25mM	50mM	100mM
PNA-/IP-	44,21 \pm 5,36 ^b	46,78 \pm 4,94 ^b	45,90 \pm 4,49 ^b	45,69 \pm 6,25 ^b	53,75 \pm 6,88 ^a
APMM	36,46 \pm 9,96 ^b	39,20 \pm 7,99 ^b	38,44 \pm 6,13 ^b	40,9 \pm 5,94 ^b	48,04 \pm 6,23 ^a
M540-/ Yo-Pro-1-	74,22 \pm 21,88	69,12 \pm 21,05	67,79 \pm 21,57	67,61 \pm 20,74	70,57 \pm 19,79
M540+/ Yo-Pro-1-	24,08 \pm 21,69	23,3 \pm 20,98	23,53 \pm 21,17	24,42 \pm 19,21	19,95 \pm 18,33

PNA-/IP-: Membrana plasmática e acrossomal intactas; APMM: alto potencial de membrana mitocondrial e M540-/Yo-Pro-1-: viáveis com membrana estável, M540+/Yo-Pro-1: viáveis com membrana desestabilizada. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença ($P < 0,05$) entre os grupos.

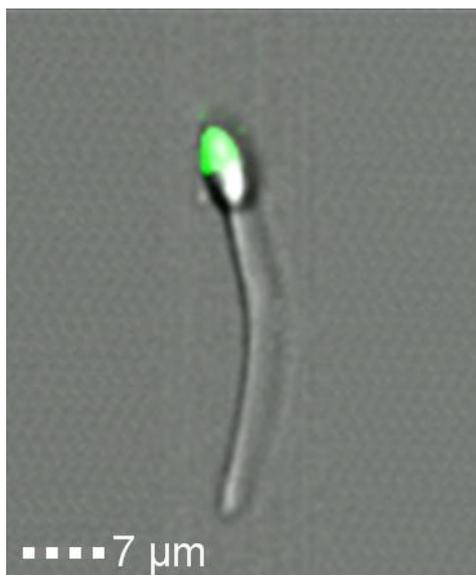


Figura 1. Espermatozoide equino, pós-descongelamento, com membrana plasmática íntegra e acrossomal danificada (IP-/PNA+).

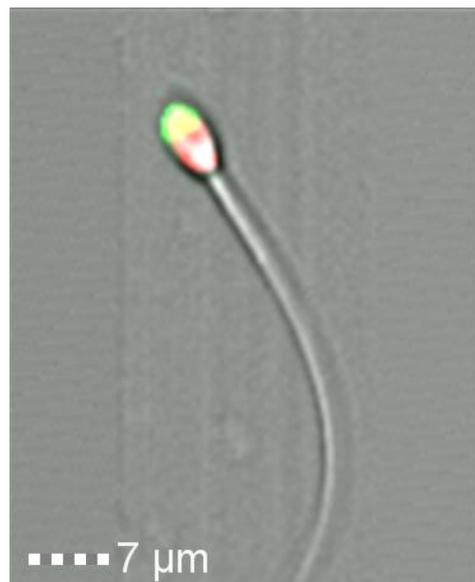


Figura 2. Espermatozoide equino, pós-descongelamento, com lesão na membrana plasmática e acrossomal (PNA+/IP+).

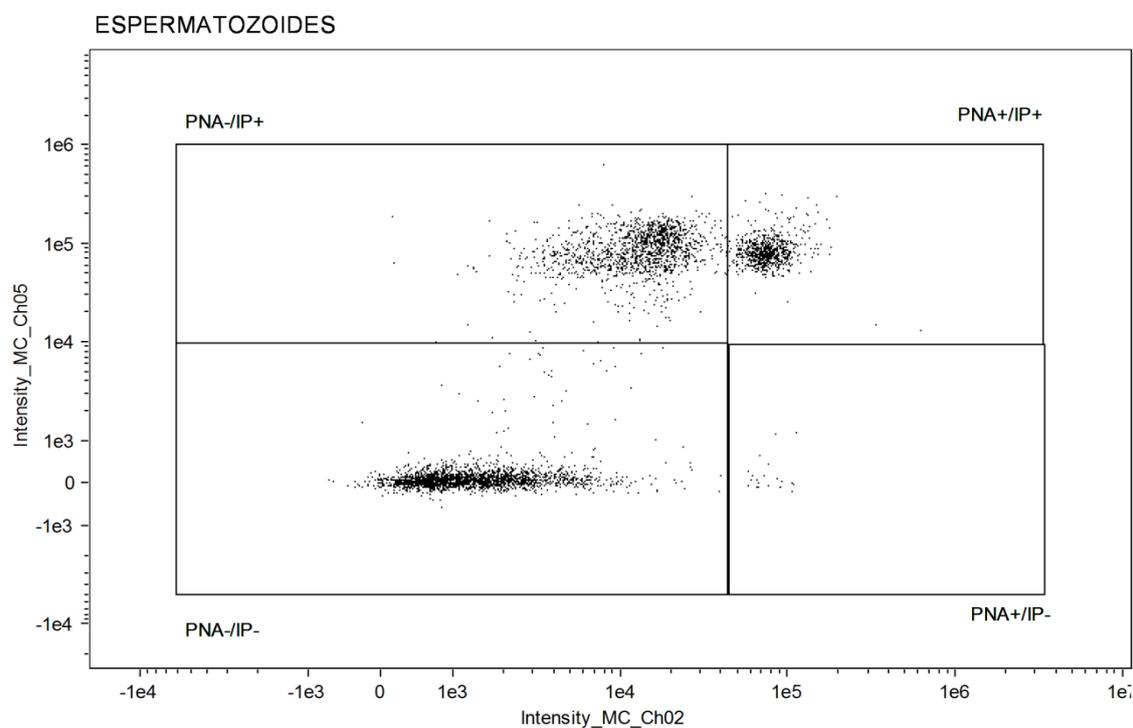


Figura 3. Dot-plot com subpopulações espermáticas de equinos, pós-descongelamento, avaliadas para integridade de membrana plasmática e acrossomal.



Figura 4. Espermatozoide equino, pós-descongelamento, com alto potencial de membrana mitocondrial.

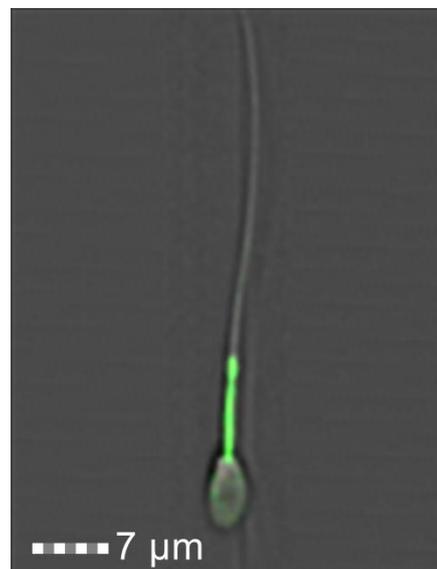


Figura 5. Espermatozoide equino, pós-descongelamento, com baixo potencial de membrana mitocondrial.