



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS**

LARISSA RODRIGUES SANTANA

**ADIÇÃO DE LDL, DHA, ROSIGLITAZONA, ERGOTIONEÍNA
OU CISTEAMINA EM MEIO BWW PARA CONGELAR
SÊMEN EQUINO**

**ILHÉUS-BAHIA
2025**

LARISSA RODRIGUES SANTANA

**ADIÇÃO DE LDL, DHA, ROSIGLITAZONA, ERGOTIONEÍNA
OU CISTEAMINA EM MEIO BWW PARA CONGELAR
SÊMEN EQUINO**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Produção e Comportamento Animal

Sub-área da Tese: Reprodução Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paola Pereira. das Neves
Snoeck

Co-orientador: Prof.^o Dr.^o. William Moraes
Machado

**ILHÉUS-BAHIA
2025**

LARISSA RODRIGUES SANTANA

**ADIÇÃO DE LDL, DHA, ROSIGLITAZONA, ERGOTIONEÍNA OU CISTEAMINA
EM MEIO BWB PARA CONGELAR SÊMEN EQUINO**

Ilhéus - Bahia, 26 de fevereiro de 2025.

Paola Pereira das Neves Snoeck- *DSc*
UESC-DCAA
(Orientador)

William Morais Machado- *DSc*
FAI
(Co-orientador)

Sandra Cristina Becker Silva - *DSc*
UESC-DCAA

Gabriel Augusto Monteiro - *DSc*
UNESP- BOTUCATU

Sildivane Valcácia Silva - *DSc*
UFPB-CBiotec

Gustavo Ferrer Carneiro - *DSc*
UFRPE-DMV

**ILHÉUS-BAHIA
2025**

Dedico esse trabalho ao meu avô, William Rodrigues, que desde o início da minha vida foi o meu maior incentivador aos estudos. Ele dizia: “O estudo é uma árvore bem grande que você planta a semente hoje e colherá os frutos amanhã”.

AGRADECIMENTOS

À Deus e todas as forças da natureza, por terem me ajudado nessa jornada tão desafiadora, com sabedoria, otimismo e muita fé.

Aos meus pais, Jailton e Simone, meus primeiros mestres, muito obrigada por me ensinarem o caminho da verdade, humanidade, justiça e responsabilidade. Um carinho especial em minha mãe, que mesmo de longe, sempre amorosa e conselheira, sofreu e vibrou comigo cada passo alcançado.

A minha irmã, Maria Vitória, por ter sido em muitas horas meu ponto de apoio e me proporcionar tantos momentos de leveza.

A minha prima, Laís, que também percorreu o caminho da pós-graduação e mesmo em áreas distintas dividiu horas de estudos na UESC, discussão de artigos e estatística, apresentação de seminários e a boa companhia do cafezinho, obrigada por seu suporte.

A toda a minha família de uma forma geral, muito obrigada por terem sido generosas, acolhedores comigo, sem dúvida a minha família é o meu porto seguro e meu local de força.

A minha orientadora, Paola Snoeck, que me acompanha nesta jornada da pesquisa desde a graduação, mestrado e doutorado, tornou-se uma mãe científica, obrigada por tantos ensinamentos ao longo destes anos, obrigada por me ensinar que desafios existem para serem enfrentados e superados, obrigada por me ensinar a ser não apenas uma profissional capacitada mas também uma mulher forte.

Ao meu co-orientador, William Machado, obrigada por tanta paciência e disponibilidade e que para além das paredes do laboratório, construímos uma grande amizade, daquelas que não se passa a mão pela cabeça, “Eu vou ser bem sincero com você!”, mas está contigo em todo momento.

Aos meus grandes amigos da pós-graduação, Raquel Niella e Luciano Cardoso, como foi bom dividir essa caminhada com vocês, obrigada pelos momentos de leveza e riso no laboratório. A minha amiga e colega de laboratório, Maíra Kersul, pela companhia em muitas horas de estudo e avaliação de espermatozoides.

As minhas estagiárias e bolsistas de iniciação científica, Kessia Sheille e Bianca Abreu, por terem abraçado este projeto e não terem medido esforços durante os meses de trabalho.

A professora Sandra Becker, que ainda no terceiro semestre da graduação, me apresentou a neuroendocrinologia da reprodução e todo o universo da reprodução animal, onde

estou desde então. Muito obrigada por toda sua contribuição para minha vida profissional e pessoal.

A todos os grandes mestres da pós-graduação que tive a oportunidade de conviver e aprender, professor Juneo Freitas, Alexandre Munhoz, Mário Lavor, Amauri Wenceslau, obrigada por terem contribuindo com a minha capacitação profissional.

Aos profissionais do campo e amigos, Tainá Pessoa e Milton Franco, por terem se empenhado em me ajudar durante a seleção dos animais e por intermediar o desenvolvimento da pesquisa nas propriedades rurais.

Aos funcionários da UESC, não citarei nomes pois são muitos mas guardo em minha memória cada um de vocês, desde o vigilante, porteiro, motorista, auxiliar de serviços gerais, técnicos de laboratório, copeiros, muito obrigada pela ajuda, muitas vezes são essas pessoas que facilitam o desenvolvimento do trabalho no laboratório ou no campo.

Por último e não menos importante, aos lindos garanhões, que inicialmente foram tão desafiadores, concluo este trabalho com o máximo amor e respeito por estes animais.

“Todas as verdades são fáceis de perceber depois de terem sido descobertas; o problema é descobri-las”.

Galileu Galilei

ADIÇÃO DE LDL, DHA, ROSIGLITAZONA, ERGOTIONEÍNA OU CISTEAMINA EM MEIO BWW PARA CONGELAR SÊMEN EQUINO

RESUMO

Este é o primeiro trabalho científico que buscou a confecção de um diluidor quimicamente definido a partir de modificações do meio BWW a ser utilizado na congelação de sêmen equino. A congelação de sêmen equino é uma técnica de reprodução assistida que possibilita a conservação de espermatozoides por tempo indeterminado, além de facilitar o transporte e maximizar o uso de ganhões, no entanto, esta prática causa redução significativa da viabilidade celular. Uma das formas de reduzir os danos estruturais e funcionais provocados por este processo, seria através da inclusão de componentes específicos aos diluidores de sêmen, o que possibilita aumentar a viabilidade espermática pós-congelação. O objetivo do experimento 1, foi a confecção de um novo diluidor, quimicamente definido a partir de modificações do meio BWW, com a capacidade de manutenção dos parâmetros espermáticos após o processo de congelação e descongelação semelhante a um diluidor comercial a base de gema de ovo. Os diluidores BWW para congelação de sêmen preservaram os parâmetros de espermatozoides rápidos, VCL, STR, ALH, integridade estrutural, compactação de DNA e atividade mitocondrial de forma semelhante ao diluidor a base de gema de ovo ($P>0,05$). Em relação a motilidade, o meio BWW, independente de sua formulação, mostrou-se menos eficaz em comparação ao meio comercial para preservar a motilidade total e motilidade progressiva ($P<0,05$). O diluidor BWW-II, contendo L-carnitina com ou sem LDL, foi menos eficaz em preservar a velocidade média, VAP, VSL, LIN e o percentual de espermatozoides morfológicamente normais em relação ao meio comercial contendo gema de ovo ($P<0,05$). O diluidor BWW-II sem LDL promoveu menor preservação de BCF e maior percentual de defeitos morfológicos menores ($P<0,05$). Concluímos que, apesar de manter alguns atributos celulares importantes, os meios quimicamente definidos BWW modificados, com a inclusão de 10% de LDL, DHA e Rosiglitazona, não preservaram de maneira eficiente a viabilidade de espermatozoides pós-congelação. Para o experimento 2, o objetivo foi avaliar se a adição dos antioxidantes Ergotioneína e Cisteamina ao melhor diluidor do experimento 1 seria capaz de melhorar a congelabilidade, preservando as características cinemáticas e funcionais do sêmen de ganhões. Os diluidores BWW, ERGO e CIS preservaram menos os parâmetros de motilidade total quando comparados ao diluidor comercial a base de gema de ovo ($P<0,05$). Os diluidores BWW e o comercial a base de gema de ovo preservaram de maneira semelhante parâmetros cinemáticos de VCL ($P>0,05$), enquanto os diluidores ERGO e CIS foram menos eficazes em relação a VCL ($P<0,05$). Na avaliação de funcionalidade de membrana, todos os diluidores testados promoveram menor preservação da integridade funcional de membrana em relação ao diluidor comercial ($P<0,05$). Nos parâmetros de integridade estrutural, compactação de DNA e morfologia espermática todos os diluidores preservaram de modo semelhante ($P>0,05$). Diante dos resultados apresentados, concluímos que os diluidores com meio BWW com associações dos antioxidantes ergotioneína e cisteamina nas concentrações de 5mM e 5mM, respectivamente, não promoveram manutenção da cinética espermática, além de promover redução da integridade funcional da membrana plasmática pós-congelação. Assim sendo, apesar do seu potencial de preservação, faz-se necessário mais estudos a fim de encontrar uma concentração mais adequada de antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidantes; criopreservação; diluidor; espermatozoide; ganhão.

ADDITION OF LDL, DHA, ROSIGLITAZONE, ERGOTHIONINE OR CYSTEAMINE IN BWW MEDIUM FOR FREEZING EQUINE SEMEN

ABSTRACT

This is the first scientific study to develop a chemically defined extender based on modifications to the BWW medium for use in equine semen cryopreservation. Equine semen cryopreservation is an assisted reproduction technique that allows for the indefinite preservation of spermatozoa, facilitates transportation, and maximizes the use of stallions. However, this practice significantly reduces cell viability. One way to minimize the structural and functional damage caused by this process is through the inclusion of specific components in semen extenders, which can increase sperm viability post-thawing. The objective of Experiment 1 was to create a new chemically defined extender, based on modifications to the BWW medium, capable of maintaining sperm parameters after the freezing and thawing process at levels comparable to a commercial egg yolk-based extender. The BWW extenders for semen cryopreservation preserved parameters such as rapid spermatozoa, VCL, STR, ALH, structural integrity, DNA compaction, and mitochondrial activity similarly to the egg yolk-based extender ($P>0.05$). However, regarding motility, the BWW medium, regardless of its formulation, was less effective than the commercial extender in preserving total motility and progressive motility ($P<0.05$). The BWW-II extender, containing L-carnitine with or without LDL, was less effective in preserving average velocity, VAP, VSL, LIN, and the percentage of morphologically normal spermatozoa compared to the commercial egg yolk-based extender ($P<0.05$). The BWW-II extender without LDL showed poorer preservation of BCF and a higher percentage of minor morphological defects ($P<0.05$). We concluded that, despite maintaining some important cellular attributes, the modified BWW chemically defined media, with the inclusion of 10% LDL, DHA, and Rosiglitazone, did not efficiently preserve sperm viability post-thawing. In Experiment 2, the objective was to evaluate whether adding the antioxidants Ergothioneine and Cysteamine to the best extender from Experiment 1 could improve cryopreservation outcomes, preserving the kinematic and functional characteristics of stallion semen. The BWW, ERGO, and CIS extenders were less effective in preserving total motility parameters compared to the commercial egg yolk-based extender ($P<0.05$). The BWW and commercial egg yolk-based extenders preserved kinematic parameters such as VCL similarly ($P>0.05$), whereas the ERGO and CIS extenders were less effective in preserving VCL ($P<0.05$). Regarding membrane functionality, all tested extenders showed less preservation of functional membrane integrity compared to the commercial extender ($P<0.05$). For structural integrity, DNA compaction, and sperm morphology parameters, all extenders performed similarly ($P>0.05$). Based on the presented results, we concluded that BWW-based extenders with the inclusion of the antioxidants Ergothioneine and Cysteamine at concentrations of 5 mM and 5 mM, respectively, did not maintain sperm kinematics and reduced the functional integrity of the plasma membrane post-thawing. Therefore, further studies are needed to determine a more suitable antioxidant concentration.

Keywords: Antioxidants; cryopreservation; extender; stallion; spermatozoa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação esquemática da anatomia espermática	19
ARTIGO 1		
Figura 1 -	Parâmetros de movimento espermático avaliados depois da descongelação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, criopreservados em diferentes diluidores.	67
Figura 2 -	Parâmetros de compactação de DNA, integridade de membrana, atividade mitocondrial e morfologia espermática avaliados depois da descongelação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, criopreservados em diferentes diluidores	69
ARTIGO 2		
Figura 1 -	Parâmetros de movimento espermático avaliados depois da descongelação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, criopreservados em diferentes diluidores	80
Figura 2-	Parâmetros de compactação de DNA, integridade de membrana e atividade mitocondrial espermática avaliados depois da descongelação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, criopreservados em diferentes diluidores	81
Figura 3-	Parâmetros de morfologia espermática avaliados depois da descongelação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, criopreservados em diferentes diluidores	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Sigla	Nome
ATP	Adenosina Trifosfato
BWW	Biggers, Whitten, e Whittingham
CIS	Cisteamina
°C	Celsius
DHA	Ácido docosa-hexaenóico
ERGO	Ergotioneína
G	Gaus
EROS	Espécies reativas de oxigênio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mL	Mililitro
mG	Miligrama
PUFAs	Ácido graxo poliinsaturado
RPM	Rotação por minute
ROSI	Rosiglitazona
LPO	Peroxidação lipídica
OXPHOS	Fosforilação oxidative

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
2. Objetivo geral.....	17
3. Objetivo específico.....	17
4. Revisão de literatura.....	18
4.1 Espermatozoide.....	18
4.2 Criopreservação de sêmen	23
4.3. Diluidores seminais.....	29
4.3.1 Diluidor quimicamente definido.....	30
4.3.2 Lipoproteínas de baixa densidade.....	33
4.3.3 L-Carnitina.....	35
4.3.4 DHA.....	37
4.3.5 Ergotioneína/Cisteamina.....	40
4.3.6 Rosiglitazona	44
5. Artigo I.....	46
6. Artigo II.....	71
7. Referências.....	97
8. Apêndice	109

1 INTRODUÇÃO

Para garantir o sucesso no processo de criopreservação, evitar e/ou reduzir os danos celulares aos espermatozoides, muitos estudos têm sido realizados a fim de se obter uma formulação de um diluidor de sêmen ideal que garanta a proteção da célula contra o choque frio e forneça aporte energético para manutenção da viabilidade espermática em condições desfavoráveis (AGUIAR *et al.*, 2020; BAHRAMI *et al.*, 2020; ORTIZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2021).

Os meios utilizados para a diluição do sêmen para a criopreservação são compostos por substâncias que atuam contra os efeitos deletérios das oscilações da temperatura; os principais componentes da formulação são gema de ovo, leite desnatado, açúcares, eletrólitos e glicerol em diferentes concentrações (OLIVEIRA *et al.*, 2013). O leite desnatado é o principal componente dos diluidores confeccionados nos processos de refrigeração, por apresentar alto teor de lipoproteínas, o que permite a estabilização da membrana celular do espermatozoide, além de ser de baixo custo e fácil acesso (CASTRO *et al.*, 2017). A gema de ovo é uma fonte lipídica com capacidade de proteger o espermatozoide contra o choque frio, porém devido à alta variabilidade de fatores como nutrição, idade e linhagem do animal, podem apresentar alteração na composição de lipídeos. Dessa forma um componente mais específico, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema do ovo vêm sendo utilizada em processos de congelação de sêmen (CONSUEGRA *et al.*, 2019).

No entanto, existe uma preocupação com a formulação de diluidores com constituintes de origem animal pelos riscos sanitários, uma vez que o transporte de material genético pode favorecer a proliferação e disseminação de microorganismos patológicos (PAPA; FELICIO, 2011) além de não apresentarem uma composição quimicamente definida (PLANTE *et al.*, 2015). Nesse sentido, a formulação de diluidores quimicamente definidos oferece maior segurança biológica e apresenta um meio com composição padronizada. Um meio quimicamente definido, descrito por Biggers, Whitten, e Whittingham (BWW) modificado por Gibb *et al.* (2015), foi testado em sêmen equino, suplementado com L-carnitina e Piruvato de Sódio em temperatura ambiente, em que apresentou manutenção dos valores cinemáticos por 72 horas em relação aos meios tradicionais. Entretanto este meio ainda não foi confeccionado para a utilização em processos de criopreservação como a congelação.

Para promover um ambiente favorável a sobrevivência do espermatozoide durante a passagem da temperatura ambiente até as faixas baixas, é necessária a inclusão de substâncias que possam fornecer estabilização da membrana, energia para o metabolismo celular, evitar a desidratação severa, peroxidação lipídica, formação de espécies reativas de oxigênio. O ácido docosahexaenoico (DHA) é um ácido graxo poliinsaturado (PUFAs) presente na membrana do espermatozoide (STEVEN *et al.*, 2005), que devido ao processo de criopreservação sofre peroxidação lipídica e provoca redução dos seus níveis nas membranas espermáticas (CEROLINI; MALDJIAN; GLIOZZI, 2001). A suplementação de DHA promove aumento dos valores de cinética espermática, da motilidade total, motilidade progressiva em sêmen refrigerado e congelado (BRISKO *et al.*, 2005).

A rosiglitazona é uma substância antidiabética (SWENGE *et al.*, 2016) que promove melhora a sensibilidade à insulina (HALLSTEN *et al.*, 2002), restauração da flexibilidade metabólica (HORAKOVA *et al.*, 2012) e aumenta a captação celular de glicose (LENNON *et al.*, 2016). Após a criopreservação, os espermatozoides apresentam redução do consumo de oxigênio mitocondrial, provocando atividade mitocondrial prejudicada devido ao estresse oxidativo e ao dano osmótico pós-congelação (DARR *et al.*, 2016). Assim, os espermatozoides criopreservados apresentam menor motilidade e menor teor de ATP comprometendo sua funcionalidade e por fim sua capacidade fertilizante. A suplementação de rosiglitazona ao meio diluidor mantém a fosforilação, promove melhora da funcionalidade mitocondrial e aumento da atividade glicolítica de espermatozoides equinos (ORTIZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

Durante a criopreservação, os espermatozoides sofrem estresse oxidativo devido ao excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), reduzindo o potencial de fertilidade do sêmen congelado (VALENTINA *et al.*, 2020). Os antioxidantes são utilizados para proteger os espermatozoides de possíveis lesões provocadas pelo estresse oxidativo que ocorrem durante todas as etapas da criopreservação (SICHERLE *et al.*, 2020). A ergotioneína é um antioxidante natural, que vem demonstrando resultados promissores devido a sua grande capacidade antioxidante (SOTGIA *et al.*, 2020). Sua atuação funciona através da eliminação de radical hidroxila (OH) e inibição da geração dependente de íons de ferro ou cobre de \bullet OH a partir do peróxido de hidrogênio (AKANMU *et al.*, 1991). A cisteamina é um antioxidante do grupo tiol, conhecido por sua potente capacidade de eliminar radicais livres e auxiliar o estado redox nas células (GUÉRIN *et al.*, 2001), levando ao aumento absorção de cisteína e consequentemente gera aumento da síntese de glutathiona (DAGHIGH KIA *et al.*, 2021; ISSELS *et al.*, 1988). Além disso, a cisteamina leva ao aumento da capacidade antioxidante e também a motilidade de espermatozoides (BUCAK *et al.*, 2007).

Levando em consideração que ainda não existem formulações diluidoras que preservem de forma eficiente o sêmen de todos os equinos durante o processo de criopreservação, objetivou-se com este estudo avaliar se o meio BWW desenvolvido por Biggers, Whitten, e Whittingham, depois de ter passado por algumas modificações, pode ser usado para congelação de sêmen equino preservando características de viabilidade importantes para o processo de fecundação, depois da inclusão de algumas substâncias como o glicerol, a dimetilformamida, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) extraída da gema de ovo de galinha, o ácido docosaheptaenoico (DHA), a rosiglitazona e os antioxidantes, ergotioneína ou cisteamina.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o meio BWW, quimicamente definido, desenvolvido por Biggers, Whitten, e Whittingham, com as modificações em sua formulação, pode ser usado para congelação de sêmen equino, preservando características de viabilidade importantes para o processo de fecundação como os meios contendo gema de ovo, depois da inclusão de algumas substâncias como o glicerol, a dimetilformamida, a lipoproteína de baixa densidade (LDL) extraída da gema de ovo de galinha, o ácido docosahexaenóico (DHA), a rosiglitazona e os antioxidantes, ergotioneína ou cisteamina.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A inclusão de concentrações de LDL, Rosiglitazona, do ácido docosa-hexaenóico, Ergotioneína e Cisteamina na formulação do diluidor base BWW modificado preserva a cinemática dos espermatozoides pós-congelação;

A inclusão de concentrações de LDL, Rosiglitazona, do ácido docosa-hexaenóico, Ergotioneína e Cisteamina na formulação do diluidor base BWW modificado preserva a integridade estrutural de membrana plasmática e acrossomal pós-congelação;

A inclusão de concentrações de LDL, Rosiglitazona, do ácido docosa-hexaenóico, Ergotioneína e Cisteamina na formulação do diluidor base BWW modificado preserva a integridade funcional de membrana plasmática pós-congelação;

A inclusão de concentrações de LDL, Rosiglitazona, do ácido docosa-hexaenóico, Ergotioneína e Cisteamina na formulação do diluidor base BWW modificado preserva a atividade mitocondrial pós-congelação;

A inclusão de concentrações de LDL, Rosiglitazona, do ácido docosa-hexaenóico, Ergotioneína e Cisteamina na formulação do diluidor base BWW modificado preserva a compactação de DNA pós-congelação;

A inclusão de concentrações de LDL, Rosiglitazona, do ácido docosa-hexaenóico, Ergotioneína e Cisteamina na formulação do diluidor base BWW modificado preserva a morfologia espermática pós-congelação.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ESPERMATOZOIDE

A comercialização de doses de sêmen de garanhões de alto valor econômico e zootécnico é o principal pilar na indústria equina, sendo a inseminação artificial a tecnologia reprodutiva mais amplamente utilizada, que, além disso, constitui a base para a transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões (PEÑA *et al.*, 2024). São considerados viáveis, aqueles espermatozoides capazes de chegar ao local de fertilização, se ligar ao oócito, fertilizar e transportar material genético para o adequado desenvolvimento embrionário (KRAWETZ, 2005). Para desenvolverem esta capacidade e realizar estas tarefas, é necessário que os espermatozoides adquiram determinadas características estruturais e funcionais específicas (ALVES; CELEGHINI; CLÉMENCE, 2020).

Estruturalmente, o espermatozoide é dividido em cabeça e cauda (Figura 1). A cabeça é segmentada em região acrossômica, porção equatorial, região pós-acrossômica e anel posterior, esta região é uma espécie de transição entre a cabeça e a cauda. As estruturas presentes na cabeça do espermatozoide são núcleo, acrossoma e partículas citosólicas. O núcleo contém o material genético altamente condensado. Essa compactação é facilitada pela substituição de histonas por protaminas, tornando o DNA mais denso e quimicamente estável (BEDFORD, 2004). O acrossomo é uma vesícula de conteúdo acrossômico, constituído principalmente de enzimas hidrolíticas (FLESCHE; GADELLA, 2000), está envolto por uma membrana acrossomal externa e uma membrana acrossomal interna. A membrana acrossomal interna está em aposição próxima a membrana nuclear, enquanto a membrana acrossomal externa está subjacente à membrana plasmática.

A cauda é segmentada em colo ou peça de conexão, peça intermediária, peça principal e peça terminal (VARNER; GIBB; AITKEN, 2014). Estão presentes na cauda, na região do colo, um par de centríolos, importantes organelas para o desenvolvimento embrionário (AVIDOR-REISS; FISHMAN, 2019). Também compõe estruturas do flagelo, o axonema, fibras densas externas, bainha fibrosa e as mitocôndrias. Podem existir, cerca de 22 a 75 mitocôndrias dentro da peça intermediária, a depender da espécie, capazes de gerar energia necessária para que o espermatozoide percorra o trato reprodutivo da fêmea, chegue ao sítio de ligação e fertilize o oócito (SONG; LEWIS, 2008).

Revestindo internamente, toda a porção da cauda está localizado o axonema, composto por nove pares periféricos e um par central de microtúbulos (INABA, 2003). Entre a peça intermediária e a peça principal está presente o ânulo, região em que a bainha mitocondrial é

substituída pela bainha fibrosa. Por toda a extensão da célula, existe uma membrana plasmática, entretanto a composição desta vai variar de acordo com os domínios regionais e função que irá desempenhar, como por exemplo: obtenção da motilidade ativada, motilidade hiperativada, penetração na matriz cúmulo-oóforo, adesão espermatozoide-zona, reação acrossomal (VARNER; GIBB; AITKEN; 2014).

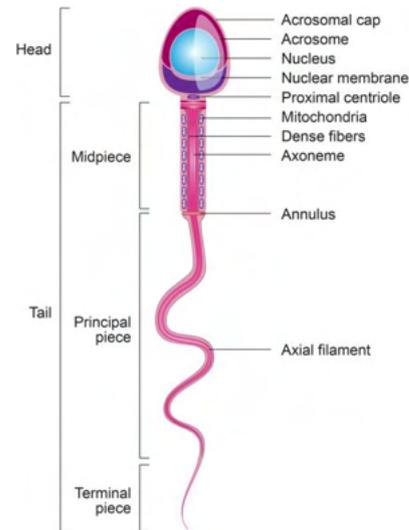


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do espermatozoide.

(<https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental>

[biology/articles/10.3389/fcell.2020.00791/full](https://www.frontiersin.org/journals/cell-and-developmental/biology/articles/10.3389/fcell.2020.00791/full))

A membrana plasmática dos espermatozoides é composta basicamente por 70% de fosfolípidios, 25 % de lipídeos neutros, 5% de glicolipídeos e variadas proteínas (MANN *et al.*, 1981;). Os fosfolípidios são considerados moléculas anfipáticas, ou seja, possuem uma extremidade sendo a mais externa hidrofílica ou polar, voltada para o meio externo e a interna hidrofóbica ou apolar (SQUIRES *et al.*, 1999). Os fosfoglicerolipídeos variam em estrutura molecular devido a diferentes grupos de cabeça polar na posição sn-3 da estrutura do glicerol (classes de fosfolípidios). Os fosfolípidios podem ser divididos em fosfoglicerolipídeos e esfingomielina. Cada classe de fosfolípidios compreende uma série de espécies moleculares devido a diferentes cadeias alifáticas acil-, alquila ou alquila/-enila ligadas às posições sn-1 ou sn-2 da estrutura do glicerol (espécies de fosfolípidios) (FLESCH; GADELA, 2000). As proteínas também são dispostas em proteínas integrais e proteínas periféricas. As proteínas

periféricas são consideradas solúveis em água e no sêmen e podem ser removidas sem dificuldade. Já as proteínas integrais, necessitam de substâncias solventes ou detergentes para serem retiradas (WATSON, 1981).

O transporte de moléculas para dentro da membrana plasmática ocorre através de poros ou canais formados pelas proteínas. Em regiões da membrana em que não há poros ou canais, o transporte de moléculas é pouco ou nulo. Na fase de refrigeração, pode ocorrer um desarranjo na conformação da membrana plasmática, levando a uma desorganização nas cadeias de fosfolipídeos e proteínas, resultando, assim, numa passagem rápida de moléculas pela membrana, que passariam de uma forma lenta. A membrana plasmática é fluida à temperatura corporal. A presença dos fosfolipídeos confere fluidez, o que permite ser capaz de realizar a movimentação lateral (AMANN; PICKETT, 1987).

O metabolismo espermático e a respiração celular desempenham um papel central na manutenção da motilidade, viabilidade e capacidade fecundante dos espermatozoides equinos. Essas células dependem de duas principais vias metabólicas: a glicólise e a fosforilação oxidativa (OXPHOS). Alguns estudos destacam as particularidades dessas vias no metabolismo equino e os desafios enfrentados durante processos como a criopreservação (AMARAL *et al.*, 2016; DÁVILA *et al.*, 2015). O metabolismo energético dos espermatozoides equinos baseia-se em dois processos principais: glicólise, que ocorre no citoplasma, é essencial em condições de baixo oxigênio. Ela utiliza substratos como glicose e frutose, comuns no plasma seminal e a fosforilação oxidativa (OXPHOS), realizada nas mitocôndrias localizadas na peça intermediária dos espermatozoides, é altamente eficiente na geração de ATP e crítica para sustentar a motilidade espermática em trajetos mais longos, como no trato reprodutivo feminino. Os espermatozoides equinos são mais dependentes da fosforilação oxidativa do que os de outras espécies, como bovinos e suínos, devido à maior densidade mitocondrial presente na peça intermediária (AMARAL *et al.*, 2016).

Os principais substratos utilizados pelos espermatozoides equinos incluem: a glicose e a frutose, que alimentam a glicólise. Já o piruvato e o lactato, exercem papéis importantes para a fosforilação oxidativa. Roverato *et al.* (2019) destacaram que o uso combinado de glicose e piruvato em diluidores seminais melhora a viabilidade espermática, favorecendo tanto a glicólise quanto a OXPHOS durante o armazenamento. Embora a fosforilação oxidativa seja eficiente na produção de ATP, ela também gera espécies reativas de oxigênio (EROs) como subprodutos. Em níveis fisiológicos, as EROs desempenham funções importantes, como na capacitação espermática e na reação acrossômica. Contudo, o excesso dessas espécies pode

induzir estresse oxidativo, causando danos à membrana plasmática, à estrutura do DNA e à integridade mitocondrial (BAUMBER *et al.*, 2020).

As EROs desempenham um papel crucial na função espermática, com mecanismos específicos para geração de ROS por meio da oxidase dependente de NAD(P)H (SABEUR; BALL, 2007). Além disso, os espermatozoides equinos produzem ATP principalmente por meio da fosforilação oxidativa mitocondrial, que é mais eficiente em comparação à glicólise (LANÇONI *et al.*, 2021). Várias técnicas foram desenvolvidas para melhorar a função e a fertilidade dos espermatozoides equinos. Por exemplo, a adição de piruvato ao meio contendo lactato pode melhorar a motilidade dos espermatozoides, mas pode reduzir os espermatozoides vivos reagidos ao acrossoma (RAMÍREZ-AGÁMEZ *et al.*, 2023). Outro fator que influencia é a presença de espécies reativas de oxigênio, em que podem afetar a motilidade, viabilidade, integridade acrossômica, potencial de membrana mitocondrial e peroxidação lipídica da membrana do espermatozoide equino, destacando a importância do gerenciamento do estresse oxidativo para manter a qualidade dos espermatozoides (BAUMBER *et al.*, 2000; CABRERA *et al.*, 2018).

A criopreservação do sêmen equino é um processo crítico, que pode comprometer o metabolismo espermático: A atividade mitocondrial é reduzida, prejudicando a fosforilação oxidativa. A produção de EROs aumenta significativamente, promovendo estresse oxidativo e danos celulares. A glicólise torna-se a principal via energética durante o armazenamento devido à menor eficiência mitocondrial (SOUZA *et al.*, 2021). Vale ressaltar que os danos espermáticos ou alterações em sua morfologia podem produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) em excesso, levando potencialmente à redução da fertilidade e a alterações relacionados à preservação do sêmen (BALL *et al.*, 2001)

Durante o processo de criopreservação, o espermatozoide passa por diversas alterações físicas e bioquímicas que podem comprometer sua funcionalidade. Essas alterações são causadas principalmente pela refrigeração, congelamento e descongelamento, que submetem as células aos estresses térmicos, osmóticos e mecânicos.

As principais mudanças que ocorrem no espermatozoide durante a criopreservação são: a) alterações na membrana plasmática, pois a membrana plasmática do espermatozoide é altamente vulnerável à congelamento e descongelamento devido à sua composição rica em ácidos graxos poli-insaturados. Durante o processo, ocorrem mudanças na fluidez da membrana, aumentando o risco de provocar perda de integridade estrutural. A criopreservação pode desestabilizar a membrana plasmática, tornando-a mais suscetível a danos oxidativos e à perda de seletividade iônica, o que compromete a viabilidade celular. Além disso, a congelamento pode

levar à formação de microfissuras na membrana, dificultando a capacitação e a fusão com o oócito (WATSON, 2000); b) formação de cristais de gelo; durante a congelação, a água no meio extracelular e intracelular se solidifica, o que pode causar a formação de cristais de gelo. Esses cristais podem perfurar organelas e a membrana plasmática, levando à morte celular. De acordo com Mazur (1984), a formação de cristais de gelo intracelulares é o principal mecanismo de lesão durante a criopreservação. A taxa de congelação adequada é essencial para minimizar a formação de gelo intracelular, favorecendo a desidratação celular controlada; c) estresse osmótico, pois a refrigeração e a congelação expõem os espermatozoides as alterações osmóticas significativas. Durante a congelação lenta, a água intracelular sai da célula para equilibrar a concentração de solutos no meio extracelular. Esse processo, se excessivo, pode causar colapso celular. O estresse osmótico causado pelas rápidas mudanças na concentração de solutos durante a congelação e a descongelação pode levar à ruptura da membrana e ao comprometimento funcional do espermatozoide (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990); d) alterações nos componentes intracelulares, em decorrência da congelação e descongelação podem provocar danos às organelas internas do espermatozoide, como o acrossoma e as mitocôndrias. Esses danos podem comprometer a capacidade de fertilização, já que o acrossoma é necessário para a penetração no oócito, e as mitocôndrias fornecem energia para a motilidade. O acrossoma é particularmente suscetível aos danos estruturais durante a congelação, o que pode prejudicar sua capacidade de realizar a reação acrossômica no momento da fertilização (HOLT E NORTH, 1994); e) produção de EROs, que podem causar peroxidação lipídica na membrana plasmática, além de danos ao DNA. Lopes *et al.* (2009) afirmaram que, o aumento na produção de EROs durante a congelação e a descongelação é um dos principais fatores que limitam a viabilidade e a integridade do DNA dos espermatozoides; f) perda de motilidade e viabilidade. Essas alterações são reflexo dos danos cumulativos sofridos durante o processo de criopreservação. A perda de motilidade e integridade pós-descongelação é resultado de uma combinação de danos osmóticos, térmicos e oxidativos, que afetam tanto a estrutura quanto a função dos espermatozoides (ANDRABI, 2007).

A criopreservação de espermatozoides envolve desafios biofísicos e bioquímicos que afetam sua viabilidade, motilidade e capacidade de fertilização. A formação de cristais de gelo é um dos principais desafios durante a criopreservação. Durante a congelação, a água presente no espermatozoide pode formar cristais de gelo intracelulares e extracelulares, que podem perfurar membranas celulares e causar danos estruturais. O uso de crioprotetores, como glicerol e dimetilsulfóxido (DMSO), ajudar a reduzir a formação de cristais de gelo (MAZUR, 2004).

Durante a exposição aos crioprotetores e o processo de congelação, há fluxos osmóticos intensos, causando encolhimento ou inchaço dos espermatozoides. A perda de volume celular excessiva pode comprometer a funcionalidade da membrana, como consequência, o estresse osmótico pode resultar em danos irreversíveis à membrana plasmática, comprometendo a integridade celular (WATSON, 2000).

Outra função celular que pode sofrer com impactos com a congelação é a motilidade espermática. A motilidade é dependente da atividade mitocondrial, uma vez que as mitocôndrias são essenciais para a produção de ATP, fornecendo assim energia para a movimentação dos espermatozoides. No entanto, estresse térmico causado durante a congelação pode danificar essa organela, reduzindo a motilidade espermática e comprometendo sua capacidade de fertilização (O'CONNELL *et al.*, 2002). Outro efeito deletério provocado pela congelação é a produção excessiva de EROs, oriunda da peroxidação lipídica e danos ao DNA espermático.

Como consequência, existe comprometendo da integridade do material genético e maior risco de redução à taxa de fertilização (AGARWAL; SAID 2005). As mudanças de temperaturas que ocorrem durante a criopreservação podem alterar a fluidez da membrana plasmática, reduzindo sua capacidade de interagir com o óvulo e diminuindo sua capacidade de fertilização (HOLT, 2000). O desafio final do processo de criopreservação para o espermatozoide, é a descongelação. Após esse processo, a taxa de sobrevivência pode variar entre 30-70%, dependendo do protocolo utilizado e da qualidade inicial do sêmen. A baixa viabilidade pós-descongelamento pode comprometer a eficácia da reprodução assistida (ISACHENKO *et al.*, 2004).

4.2 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

A criopreservação de sêmen equino é uma técnica essencial na reprodução assistida, pois permite o armazenamento de espermatozoides a temperaturas extremamente baixas por longos períodos de tempo. Essa biotecnologia oferece vantagens significativas, como a possibilidade de transporte do material genético a longas distâncias, a criação de bancos genéticos de ganhões de alto valor e a preservação de raças específicas ou ameaçadas de extinção. (OLIVEIRA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2014). A criopreservação também contribui para minimizar perdas econômicas advindas da morte de reprodutores de alto valor comercial ou que participem de programas de revitalização de raças, para a preservação contra a extinção de raças nativas e conservação de espécies ameaçadas (WATSON, 2000; DOMENICO *et al.*, 2015).

Existem diversas vantagens na utilização de sêmen congelado, especialmente no manejo reprodutivo de cavalos, entre elas podemos citar: a) preservação genética a longo prazo, uma vez que, a congelação permite preservar o material genético de garanhões valiosos, garantindo que sua genética possa ser utilizada por muitas gerações (LOOMIS;GRAHAM, 2008); b) facilidade de transporte internacional, pois tratando-se de sêmen congelado pode ser transportado facilmente para diferentes regiões ou países, reduzindo custos e riscos associados ao transporte de animais vivos (VARNER *et al.*, 2012); c) redução do risco de transmissão de doenças. O uso de sêmen congelado reduz o contato direto entre animais, diminuindo o risco de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis (SAMPER, 2009); d) disponibilidade contínua do sêmen. Mesmo durante períodos de indisponibilidade do garanhão (competição, doença ou morte), o sêmen congelado permite que ele continue a contribuir para programas de reprodução (SILVA & GADELLA, 2006); e) maximização da eficiência reprodutiva. O sêmen congelado pode ser usado em diferentes momentos, permitindo maior flexibilidade para inseminações em relação ao ciclo estral das éguas (SQUIRES *et al.*, 2003).

Apesar dos inúmeros benefícios, a criopreservação de sêmen é um processo desafiador ao espermatozoide, uma vez que pode causar danos celulares, resultando em redução da motilidade, integridade da membrana plasmática e viabilidade. Esses efeitos deletérios são atribuídos ao estresse térmico, mecânico, químico e osmótico que as células espermáticas sofrem durante o processo (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Para reduzir esses efeitos adversos, pesquisas têm focado no desenvolvimento de diluentes e crioprotetores mais eficazes. Estudos indicam que o uso de amidas como crioprotetores penetrantes nos diluentes seminais pode levar a um incremento na motilidade espermática pós-descongelamento e melhorar a preservação da integridade das membranas plasmáticas em comparação com o glicerol tradicionalmente utilizado (TERRACIANO *et al.*, 2008). Além disso, a eficácia da criopreservação pode variar entre indivíduos e mesmo entre ejaculados do mesmo animal, destacando a importância de pesquisas contínuas para melhorar os protocolos de criopreservação e manter a viabilidade espermática na descongelação (GUIMARÃES *et al.*, 2018). Alguns garanhões apresentam sêmen com alta congelabilidade, enquanto outros mostram resultados insatisfatórios. Essa diferença destaca a importância de protocolos personalizados, ajustando diluidores, crioprotetores e curvas de congelação para cada indivíduo, visando otimizar a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides após o descongelamento (VIDAMENT *et al.*, 1997).

A tecnologia envolvida na criopreservação permite que células espermáticas, tecidos ou embriões sejam armazenados em temperaturas abaixo do ponto de congelação da água, reduzindo o metabolismo celular e preservando as células por tempo indefinido (DOMENICO

et al., 2015). Os princípios da criopreservação de sêmen equino envolvem fundamentos biológicos e tecnológicos destinados a preservar a viabilidade dos espermatozoides durante a congelação e a descongelação. Esses princípios são aplicados para minimizar os danos estruturais e funcionais causados pelos processos de refrigeração, congelação e posterior descongelação. Um dos principais fatores a ser considerado durante a congelação, é o controle preciso das curvas de congelação para garantir a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides após a descongelação. Um estudo avaliando o efeito de diferentes taxas de congelação no sêmen de garanhões com baixa resistência a congelabilidade da raça Mangalarga Marchador demonstrou que ao utilizar curvas de congelação mais rápidas, como $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre 5°C e -100°C , causaram menos danos aos espermatozoides em comparação com curvas mais lentas. Ficou evidente no estudo que, o uso de curvas de congelação mais rápida, promoveu melhores parâmetros de cinética espermática, provando que curvas mais rápidas são mais indicadas para manter a viabilidade seminal na criopreservação seminal dessa raça (VITA *et al.*, 2019). Outros estudos indicam que a taxa de congelação ótima para sêmen equino pode variar entre $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-100^{\circ}\text{C}/\text{min}$, dependendo de fatores individuais e raciais dos garanhões (SIEME *et al.*, 2008).

O sêmen é inicialmente refrigerado até cerca de 5°C antes de ser congelado, este processo deve ser realizado de forma gradual, podendo utilizar uma taxa de refrigeração variável em torno de valores iguais ou inferiores a $0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (PICKETT; AMANN, 1993), $0,25^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (PAPA, 2020) até $0,1$ a $0,3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ e controlada para evitar o choque térmico. Este momento da refrigeração é considerado a primeira fase crítica ao espermatozoide, denominada fase de transição, pois neste momento ocorre modificações estruturais em que a célula passa do estado cristalino para o estado semelhante a gel (MAZUR, 1970; WATSON, 1979; GRAHAM, 1996).

Durante este período, ocorrem modificações na conformação de fosfolipídeos de membrana, o que pode provocar à formação de novos arranjos de moléculas, como a configuração hexagonal II em que os fosfolipídeos não integrantes movimentam suas cabeças do grupamento polar para o centro e as caudas hidrocarbonadas ficam expostas. Essa configuração forma pontos de fragilidade na membrana plasmática, tornando a barreira de permeabilidade mais sensível, aumentando o risco de ruptura da membrana, causando perda de substâncias essenciais ao funcionamento do espermatozoide, desnaturação de proteínas responsáveis pela entrada e saída de moléculas entre os meios intra e extracelulares (AMANN; PICHETT, 1987). Estudos demonstram que a taxa de resfrigeração influencia diretamente a integridade da membrana espermática e a motilidade após a descongelação (CONTRI *et al.*, 2013).

Os espermatozoides equinos são particularmente sensíveis aos danos causados pelo processo de congelação e descongelação, exigindo o uso de diluidores e crioprotetores específicos para garantir sua viabilidade e fertilidade (VARNER *et al.*, 2015). Visando minimizar as lesões causadas pela diminuição abrupta de temperatura nos processos criopreservação, a adição de diluidores torna-se extremamente necessária. Eles são formulados para manter a viabilidade celular e reduzir danos oxidativos e osmóticos. Os diluidores possuem uma combinação de substâncias crioprotetores que, quando adicionadas ao sêmen, depois da retirada do líquido seminal, auxiliam na proteção dos espermatozoides na congelação, protegendo-os contra a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, além de outros danos estruturais (OLIVEIRA, *et al.*, 2013).

Os crioprotetores são substâncias essenciais na criopreservação de sêmen equino, pois minimizam os danos celulares causados pelo congelação e descongelação. Eles podem ser classificados em penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores penetrantes são pequenas moléculas que com capacidade de atravessar a membrana celular e proteger contra a formação de cristais de gelo intracelulares. São eles o glicerol, o propilenoglicol, o etilenoglicol, a acetamida e outras amidas, o 1,2 propanodiol e o dimetilsulfóxido. Os mais utilizados no sêmen equino são o glicerol, sendo ele o crioprotetor mais comumente utilizado, geralmente em concentrações de 2% a 5% (LOOMIS, 2006) que, apesar de seus efeitos tóxicos quando utilizados em concentrações inadequadas, é eficaz na defesa contra as lesões da congelação. Por ser uma molécula de baixo peso molecular que permite atravessar a membrana plasmática, sua ação consiste em reduzir a formação de cristais de gelo intracelulares (OLIVEIRA, *et al.*, 2017). O glicerol substitui a água no interior da célula, reduzindo o volume intracelular e impedindo a formação de cristais de gelo. Isso preserva a integridade da membrana plasmática e das organelas espermáticas durante a congelação e descongelação (GARCÍA *et al.*, 2020). Também é utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO), alternativa ao glicerol, com maior permeabilidade celular, mas pode causar toxicidade em algumas condições (GARCÍA *et al.*, 2012) e o etilenoglicol, o qual apresenta menor toxicidade e melhor permeabilidade que o glicerol, sendo estudado como substituto potencial (PAPA *et al.*, 2011).

Para reduzir esses efeitos adversos, pesquisas têm focado no desenvolvimento de diluentes e crioprotetores mais eficazes. Estudos indicam que o uso de amidas como crioprotetores penetrantes nos diluentes seminais pode levar a um incremento na motilidade espermática pós-descongelação e preserva a a integridade das membranas plasmáticas em comparação com o glicerol tradicionalmente utilizado (TERRACIANO *et al.*, 2008). A dimetilformamida, é conhecida por diminuir de forma significativa os efeitos deletérios da

congelamento (MEDEIROS *et al.*, 2002; SQUIRES *et al.*, 2004). Isso é atribuído ao seu menor peso molecular em comparação aos crioprotetores como o glicerol e, portanto, ao seu maior potencial de atravessar a membrana plasmática; resultando em um equilíbrio mais rápido entre as regiões intra e extracelulares e, teoricamente, em um menor potencial de gerar danos aos espermatozoides por choque osmótico (MOFFET *et al.*, 2003). O uso de dimetilformamida proporcionou um aumento pós-descongelamento na motilidade dos espermatozoides e na integridade da membrana plasmática, em comparação ao uso de glicerol (VIDAMENT *et al.*, 2002; MESA; HENAO, 2012).

Outras substâncias consideradas crioprotetores não penetrantes também são utilizadas, elas não entram na célula, mas atuam protegendo a membrana plasmática e reduzindo o estresse osmótico. São elas a gema de ovo, frequentemente utilizada devido às suas lipoproteínas, promovendo proteção à membrana celular contra os danos pela congelamento (VIDAMENT *et al.*, 2000). Normalmente adicionada aos diluidores em concentrações entre 10 e 20%, devido à presença de componentes como as lipoproteínas de baixa densidade, que estabilizam a membrana plasmática dos espermatozoides e evitam danos causados por choques térmicos (MEDEIROS *et al.*, 2002). O leite desnatado por conter proteínas e outros compostos que estabilizam a membrana plasmática dos espermatozoides durante a criopreservação, reduzindo a perda de integridade e funcionalidade (AMANN; PICKETT, 1987). Açúcares como a trealose e a sacarose protegem os espermatozoides contra o choque osmótico e danos oxidativos durante a congelamento, contribuindo para uma melhor taxa de recuperação na descongelamento (BAILEY *et al.*, 2000). A adição de antioxidantes aos meios de refrigeração e congelamento de sêmen tem sido explorada como uma estratégia para proteger os espermatozoides contra o estresse oxidativo induzido pelas espécies reativas ao oxigênio, prevenindo a perda irreversível da motilidade, a peroxidação lipídica e a fragmentação do DNA, fatores que podem afetar a capacidade de fertilização dos espermatozoides (SANTOS *et al.*, 2019).

O processo de congelamento envolve exposição dos espermatozoides a baixas temperaturas, o que pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), particularmente quando espermatozoides equinos são submetidos a congelamento em comparação à refrigeração. Para reduzir os efeitos prejudiciais de EROs e estresse oxidativo durante a congelamento, a adição de antioxidantes como glutathione peroxidase e cisteína ao diluidor tem sido explorada como uma estratégia para proteger as células espermáticas de danos oxidativos (BARROS *et al.*, 2013). As etapas de congelamento e descongelamento são estágios críticos na criopreservação de espermatozoides, pois podem impactar significativamente a qualidade e a viabilidade do espermatozoide. Estudos têm mostrado que este período é responsável pela maior porcentagem

de danos às características espermáticas, incluindo integridade da membrana plasmática, integridade da membrana acrossômica e potencial mitocondrial (ZOCA *et al.*, 2021).

A taxa de congelação é uma etapa crítica no processo de criopreservação, pois afeta diretamente a viabilidade dos espermatozoides após a descongelação. A formação de cristais de gelo durante a congelação rápido ou lento pode danificar as membranas celulares. A taxa de congelação é uma variável crítica no sucesso da criopreservação, pois influencia diretamente na formação de cristais de gelo e os danos às células. A congelação excessivamente rápida pode causar desidratação extrema, enquanto a congelação muito lenta pode favorecer a formação de cristais intracelulares, que rompem as membranas celulares. Segundo Mazur (1970), uma taxa de congelação ideal deve equilibrar a remoção gradual de água e a minimização de danos mecânicos.

Watson (2000) ressalta que a sobrevivência espermática após a congelação depende do equilíbrio entre a taxa de formação de gelo e os efeitos osmóticos no ambiente celular. A faixa crítica de temperatura para os espermatozoides é 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 (WATSON, 2000; CHAVEIRO *et al.*, 2006). Durante este intervalo, ocorre uma mudança no gradiente osmótico entre os meios intra e extracelular, alterando o equilíbrio e desse modo acontece a desidratação celular. Neste ponto, a taxa de congelação deve ser lenta, para evitar a congelação da água intracelular. A perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, por reduzir a probabilidade de se formarem grandes canais de gelo intracelulares que causam danos as estruturas internas, assim como à membrana plasmática (SQUIRES, 1999). No entanto, a desidratação severa promove a desnaturação de macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, levando ao colapso da membrana plasmática (MEDEIROS, 2007).

Dessa forma, uma taxa ideal de desidratação deve ser lenta o suficiente para permitir a desidratação adequada dos espermatozoides, a fim de evitar a formação de grandes cristais de gelo intracelular, e rápida o bastante para evitar a exposição dos espermatozoides nas soluções hiperosmóticas, no momento da formação de cristais de gelo, ao ambiente extracelular (GRAHAN, 1996; WATSON, 2000; VARNER, 2007). Antes da utilização para a inseminação artificial, o sêmen passa pelo processo de descongelação, geralmente em água a 37°C por 30 segundos. A descongelação, considerada rápida, reduz a formação de cristais de gelo secundários, que podem danificar os espermatozoides. Após a descongelação é indispensável

uma análise para avaliar a qualidade do sêmen e prever a sua fertilidade (LOOMIS; GRAHAM, 2008).

4.3 DILUIDORES SEMINAIS

Os diluidores de sêmen são compostos essenciais durante o processo de criopreservação e armazenamento de espermatozoide para manter a qualidade e a viabilidade. Esses diluidores contêm nutrientes, tampões e agentes protetores cruciais para a sobrevivência dos espermatozoides durante a congelação e descongelação, com composições adaptadas para atender as necessidades dos espermatozoides, com particularidades espécies específicas. Estudos indicaram que a incorporação de componentes como a LDL, antioxidantes, agentes crioprotetores e íons em diluidores pode melhorar a qualidade do sêmen e protegê-lo de danos durante a criopreservação (DALAL *et al.*, 2020; KUMAR *et al.*, 2022; MAKAREVICH *et al.*, 2022). Esses compostos fornecem nutrientes suficientes para garantir a motilidade espermática, a integridade da membrana e a capacidade de fertilização, apoiando a preservação do material genético para tecnologias reprodutivas. Os diluidores também facilitam o processo de capacitação, fundamental para a maturação e fertilização do gameta, criando um ambiente propício que mimetiza o trato reprodutivo feminino (MCGETRICK *et al.*, 2014).

Os diluidores têm a função de fornecer nutrientes, estabilizar o pH e proteger os espermatozoides durante o processo de criopreservação. Comumente, são utilizados diluidores à base de gema de ovo ou leite desnatado. A gema de ovo é reconhecida por sua eficiência como crioprotetor não penetrante, auxiliando na proteção contra o choque térmico. Estudos indicam que diluidores com maior osmolaridade tendem a preservar melhor o sêmen equino congelado com etilenoglicol ou acetamida, resultando em melhores índices de viabilidade espermática pós-descongelação (SNOECK *et al.*, 2007).

A seleção de componentes diluidores, como gema de ovo, glutatona, quelantes de cálcio e ácidos graxos, pode influenciar o metabolismo a célula, o estresse oxidativo e os parâmetros seminais pós-descongelação, protegendo o espermatozoide de crioinjúria e mantendo o potencial de fertilidade (MUNSI *et al.*, 2007; SUSHADI, 2023; TOWHIDI & PARKS, 2012).

Os diluentes de sêmen equino são classificados de acordo com sua composição e funcionalidade. A classificação principal inclui diluentes de refrigeração, congelação, transporte. Esses diluidores podem ser enriquecidos com diferentes constituintes, como antibióticos, açúcares, gema de ovo e aminoácidos, para otimizar a proteção espermática. No Brasil, diversos diluidores comerciais estão disponíveis para uso na inseminação artificial equina. Alguns dos mais utilizados incluem: Existem diversos diluentes comerciais disponíveis

para a preservação do sêmen equino, cada um com características específicas que atendem a diferentes necessidades de manejo reprodutivo. Entre a imensa variedade, os mais utilizados são: INRA 96®, amplamente utilizado na preservação de sêmen equino. Estudo comparativo entre o INRA 96® e o Equiplus® demonstrou que o INRA 96® forneceu melhores resultados na refrigeração do sêmen de garanhão às 0, 24 e 48 horas, sendo para este último tempo estatisticamente significativo (MAXIMO, 2022); BotuSêmen®, desenvolvido para a preservação de sêmen fresco e refrigerado, possui em sua constituição contém leite em pó desnatado, açúcares e aminoácidos, oferecendo um meio adequado para a maioria dos garanhões, permitindo o transporte seguro dos espermatozoides até o momento da inseminação ou durante o processo de centrifugação para congelação Botu-Crio®, especificamente formulado para a congelação de sêmen equino (CANISSO et al., 2008), o Botu-Crio® tem demonstrado eficiência na manutenção da motilidade, vigor e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides após o descongelamento. Estudos indicam que este diluidor é eficaz na preservação das características seminais pós-criopreservação. (COSTA *et al.*, 2014) e uma novidade para o mercado equino; Beyond®, consiste em um diluente sintético e quimicamente definido que permite o armazenamento de sêmen equino por até 14 dias a +5 °C, oferecendo maior flexibilidade no calendário de inseminações e reduzindo a frequência de coletas dos garanhões, o Beyond® é reconhecido como uma inovação na preservação de sêmen equino (AGOSTINHO, 2024).

A escolha do diluidor adequado deve considerar fatores como o tempo de armazenamento desejado, as condições de transporte e as características individuais do garanhão. A composição adequada para um diluidor seminal não depende apenas de uma concentração de crioprotetores, tanto intra como extracelulares, mas de uma combinação adequada de todas as substâncias que são utilizadas, levando-se em consideração a fonte de energia para os espermatozoides, as substâncias não iônicas, o tipo de macromoléculas, concentração e o tipo ideal de crioprotetor. As diversas possibilidades para a confecção de diluidores reforça que o diluidor ideal, que garanta todas as necessidades dos espermatozoides durante os processos de criopreservação para os diferentes tipos de garanhões, ainda não foi desenvolvido e é alvo de inúmeras pesquisas (SNOECK *et al.*, 2007).

4.3.1 DILUIDOR QUIMICAMENTE DEFINIDO – BWW

Nomeou-se BWW, o meio diluidor criado por Biggers, Whitten e Whittingham, tendo como referenciais as letras iniciais de seus nomes. Este meio teve como objetivo inicial manter o desenvolvimento embrionário e a viabilidade de embriões de camundongos cultivados *in*

vitro. É representado como um diluidor quimicamente definido, uma vez que possui em sua composição: substâncias com efeito osmótico, sistemas tampão, componentes que suportam controle da motilidade e do metabolismo energético (BIGGERS *et al.*, 1971). Seu uso tornou-se amplamente difundido como diluidor de espermatozoides, em especial nas análises complementares. Foi avaliado o uso do meio BWW com diferentes osmolaridades e seus fatores envolvidos no choque osmótico nas estruturas espermáticas de equinos. (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012). Também foi avaliado os efeitos de diferentes meios (INRA-96™, EquiPRO CoolGuard™ e Biggers, Whitten e Whittingham-BWW) e diferentes promotores de ROS / LPO em diferentes ensaios de peroxidação lipídica (GHOSH *et al.*, 2019).

Gibb *et al.* (2015) descreveram o uso do meio BWW, suplementado com L-carnitina e piruvato de sódio com capacidade para preservar sêmen equino em temperatura ambiente, garantindo valores de movimento espermáticos por 72 horas em relação aos meios tradicionais comumente usados para refrigeração de sêmen equino. Entretanto, não foram encontrados relatos na literatura com uso deste meio base para refrigerar e congelar o sêmen equino.

Este meio quimicamente definido foi formulado para mimetizar as condições iônicas e metabólicas do trato reprodutivo feminino, favorecendo processos como capacitação, motilidade e reação acrossômica dos espermatozoides. A capacitação é um processo crucial para que os espermatozoides adquiram a capacidade de fertilizar o oócito. O meio BWW contribui para esse processo ao promover alterações na membrana plasmática dos espermatozoides, como a remoção de colesterol mediada pela albumina sérica bovina (BSA).

Segundo Silva *et al.* (2022), o uso de BSA no meio BWW estimula o aumento da fluidez da membrana plasmática, facilitando os rearranjos lipídicos necessários para a ligação à zona pelúcida e a subsequente reação acrossômica. Essa etapa é essencial para a fertilização, uma vez que permite a liberação de enzimas hidrolíticas armazenadas no acrossomo. O meio BWW fornece substratos energéticos, como glicose, piruvato e lactato, que sustentam a motilidade espermática. Além disso, a presença de íons, como cálcio (Ca^{2+}), desempenha um papel vital na ativação da motilidade flagelar.

Conforme descrito por Biggers *et al.* (1971), o influxo de cálcio intracelular aumenta a amplitude dos batimentos flagelares, permitindo que o espermatozoide navegue eficientemente em direção ao oócito. O pH estável, controlado pelos tampões bicarbonato e HEPES, também é um fator determinante para a funcionalidade espermática. A reação acrossômica, que é desencadeada durante a interação com a zona pelúcida do oócito, sendo este um evento determinante para a fertilização. Estudos mostram que o meio BWW contém bicarbonato, que ativa a enzima adenilato ciclase, levando à produção de AMPc e à ativação da proteína quinase

A (PKA). Este processo regula os eventos moleculares que culminam na fusão do acrossomo e na liberação de enzimas (WHITTINGHAM *et al.*, 1972).

O bicarbonato é um componente crítico para a indução da reação acrossômica, especialmente em sistemas que simulam condições fisiológicas. Durante procedimentos laboratoriais, como manipulação e armazenamento do sêmen, é fundamental preservar a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides. O meio BWW, ao oferecer um ambiente osmoticamente estável e quimicamente definido, minimiza danos celulares e o estresse oxidativo. De acordo com Lopes *et al.* (2021), a combinação de sais inorgânicos e proteínas, como a BSA, no meio BWW ajuda a reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio, preservando a viabilidade e a funcionalidade dos espermatozoides.

Machado *et al.* (2023), avaliaram a eficácia do meio BWW modificado na refrigeração do sêmen equino. O estudo investigou a adição de diferentes concentrações de lecitina de soja (LS) ao meio BWW para armazenar sêmen equino a 15°C. Os resultados indicaram que o meio BWW com a inclusão de 2% a 6% de lecitina de soja no meio BWW permitiu a manutenção da viabilidade do sêmen equino refrigerado a 15°C por até 24 horas. O mesmo grupo de pesquisa ainda investigou a refrigeração do sêmen equino a 5°C utilizando o meio BWW modificado com a adição de ácido docosahexaenóico (DHA), rosiglitazona (ROSI) e lipoproteína de baixa densidade (LDL). Os resultados sugeriram que, embora o meio BWW modificado seja uma alternativa viável para a refrigeração a 15 °C, seu uso para armazenar amostras de semen equino a 5 °C não é indicada, pois o desempenho não foi homogêneo, já que 80% das amostras não sobreviveram por 48 horas de refrigeração. Além disso, a concentração de LDL utilizada não potencializou o meio BWW para refrigeração, destacando a necessidade de ajustes na formulação para preservar o semen em temperaturas mais baixas.

O meio BWW é um produto de grande importância para as pesquisas na área de preservação de espermatozoides, uma vez que é capaz de proporcionar condições controladas para essa célula. Sua composição única favorece a capacitação, promove a motilidade e a reação acrossômica, além de preservar a viabilidade espermática durante procedimentos laboratoriais. No entanto, ainda precisa ter sua formulação ajustada para garantir resultados eficientes quando o objetivo é manter os espermatozoides refrigerados à 15 °C, 5 °C ou a -196 °C.

4.3.2 LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é uma fonte primária de colesterol para os espermatozoides e desempenha um papel importante no metabolismo espermático, principalmente no fornecimento de colesterol para a membrana plasmática e na regulação da capacitação espermática. Esse colesterol é incorporado à membrana plasmática, ajudando a manter sua estabilidade antes da capacitação espermática (FLESCHE; GADELLA, 2000). A capacitação espermática é um processo pelo qual os espermatozoides sofrem modificações bioquímicas e estruturais para adquirir a capacidade de fertilizar o oócito. Durante esse processo, ocorre a remoção de colesterol da membrana plasmática, o que aumenta sua fluidez e facilita a fusão com o gameta feminino (VISCONTI *et al.*, 1995). A remoção do colesterol da membrana espermática pode ser mediada por proteínas de transporte de lipídios, como a albumina e as lipoproteínas de alta densidade (HDL), mas a LDL também pode contribuir para esse processo indiretamente ao modular os níveis de colesterol disponíveis (HOLT, 2010). A reatividade acrossômica é um evento necessário para a fertilização e pode ser influenciada pela composição lipídica da membrana espermática. A redução do colesterol promovida pela LDL facilita a fusão da membrana acrossomal e a liberação de enzimas essenciais para a penetração do oócito (RATHI *et al.*, 2001).

Durante o processo de congelamento, a LDL age na proteção dos espermatozoides, atuando na preservação da integridade da membrana plasmática e reduzindo os danos causados pelo estresse osmótico e pelo choque térmico. Seu mecanismo de ação consiste na interação com as proteínas de ligação ao espermatozoide (BSPs), modulando a remoção de colesterol e influenciando a estabilidade da membrana espermática (BERGERON *et al.*, 2005; MANJUNATH, 2012).

As BSPs são glicoproteínas presentes no plasma seminal de diversas espécies e desempenham um papel fundamental na modulação da estabilidade da membrana espermática. Durante a criopreservação, a LDL interage com as BSPs de diferentes maneiras, através da modulação da remoção de colesterol (BERGERON *et al.*, 2005), estabilização da membrana espermática, ligando-se à superfície do espermatozoide, facilitando a interação com as lipoproteínas e dessa forma, auxilia a manutenção da fluidez da membrana e reduz os efeitos deletérios da congelamento (MANJUNATH; THERIEN, 2002). Além disso, a interação das BSPs com a LDL, promove redução da peroxidação lipídica, minimizando a oxidação dos lipídios da membrana espermática, reduzindo os danos causados pelo estresse oxidativo durante a congelamento (THÉRIEN *et al.*, 1999).

A LDL interage com as BSPs impedindo o efluxo de colesterol da membrana espermática. Esse mecanismo ocorre porque as BSPs têm alta afinidade por lipídios e interagem com lipoproteínas, como a LDL, modulando a remoção de colesterol da membrana do espermatozoide. No entanto, quando a LDL está presente, ela pode atuar como um reservatório de colesterol, competindo com a membrana espermática pela ligação às BSPs. Isso reduz a taxa de efluxo de colesterol e mantém a estabilidade da membrana por mais tempo. (MANJUNATH, 2012). Thérien et al. (1999) também destacam que a presença de LDL inibe parcialmente a remoção de colesterol mediada pelas BSPs, o que pode ser benéfico durante a criopreservação, pois preserva a integridade da membrana espermática contra danos estruturais. Esse efeito é particularmente útil na formulação de diluentes para congelamento de sêmen, onde a LDL é utilizada para minimizar a perda excessiva de colesterol e manter a viabilidade espermática após a descongelamento.

As LDLs possuem também propriedades antioxidantes que ajudam a reduzir os danos causados pela formação de EROs, que são exacerbadas durante o processo de criopreservação. Foram realizados estudos em diluidores seminais, demonstrando efeitos benéficos na qualidade espermática e no estresse oxidativo após a criopreservação em várias espécies animais (PERUMAL *et al.*, 2016). A LDL também foi estudada por seu potencial para melhorar os parâmetros de qualidade do sêmen canino pós-descongelamento, indicando seu papel na melhoria da viabilidade, motilidade e integridade da membrana do espermatozoide. Embora a gema de ovo seja tradicionalmente usada em diluidores de sêmen, a fração de LDL isolada apresenta benefícios específicos, como maior pureza e eficácia na proteção espermática. Além disso, o uso de LDL reduz o risco de contaminações e variabilidade associadas ao uso da gema de ovo *in natura* (ELBEHIRY *et al.*, 2023). Amirat *et al.* (2004) relataram que a substituição da gema de ovo pela LDL em diluidores para sêmen equino resultou em melhor proteção celular e maior qualidade espermática após a congelamento.

A LDL vem sendo estudada como substituta da gema de ovo em diluentes para a congelamento demonstrando ser tão eficiente quanto a gema de ovo inteira para congelar sêmen de garanhão (PILLET *et al.*, 2001). Diferentes concentrações de LDL (5, 7,5, 10 e 15%) foram testadas e observado que na concentração de 7,5% promoveram melhor qualidade do espermatozoides de garanhão após a criopreservação nos parâmetros de integridade de mitocôndrias, membrana e acrossomo além de redução de danos ao DNA (EL-BADRY *et al.*, 2015). Outros estudos demonstraram que a concentração de 8% de LDL pode ser eficaz em preservar parâmetros cinéticos de sêmen equino. (MARTIN *et al.*, 2005). Snoeck *et al.* (2019) observaram que 12% de LDL adicionada ao diluidor BotuCrio promoveu redução da motilidade

progressiva, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, a porcentagem de hiperativos e funcionalmente intactos. Moreno et al. (2013) observaram melhores resultados no diluente de 2% de LDL, demonstrando resultados superiores de espermatozoides móveis pós-descongelamento, integridade funcional de membrana plasmática e integridade estrutural.

Diante disso, a LDL surgiu como um componente valioso na preservação e criopreservação do sêmen, contribuindo para a manutenção da qualidade, integridade e funcionalidade do espermatozoide durante os processos de armazenamento e congelação. Seus efeitos protetores nas células espermáticas o tornam um aditivo promissor em diluentes de sêmen para várias espécies animais, ressaltando sua importância em garantir resultados reprodutivos bem-sucedidos.

4.3.3 L- CARNITINA

L-Carnitina, um composto natural, tem sido o foco de vários estudos que investigam seus efeitos na qualidade do sêmen, motilidade e saúde reprodutiva geral. Pesquisas destacaram os benefícios potenciais da suplementação de L-Carnitina na melhoria dos parâmetros espermáticos e no tratamento de problemas relacionados à infertilidade masculina (BADR *et al.*, 2017). Um estudo demonstrou que a L-Carnitina melhora significativamente a motilidade, morfologia, concentração e níveis de testosterona do espermatozoide, indicando seu impacto positivo na qualidade do sêmen e na função reprodutiva masculina (MAHNAZ *et al.*, 2024). Outro estudo descobriu que o efeito benéfico da L-Carnitina na motilidade espermática pós-congelação foi mais pronunciado em amostras com altos níveis endógenos de L-Carnitina seminal em comparação com aqueles com níveis baixos (ILICETO *et al.*, 2024).

O transporte de ácidos graxos para os espermatozoides é um processo essencial para garantir a produção de energia necessária à sua motilidade e funcionalidade. Esse transporte é mediado principalmente pela L-carnitina, uma molécula que desempenha um papel fundamental no metabolismo energético celular. Nos espermatozoides, os ácidos graxos de cadeia longa são transferidos para as mitocôndrias por meio do sistema carnitina-palmitoiltransferase (CPT), que envolve a conversão dos ácidos graxos em acil-CoA e, posteriormente, em acil-carnitina, facilitando sua entrada na mitocôndria (STRADAIOLI *et al.*, 2004). Foi demonstrado que a L-carnitina participa da conversão de acetilCoA mitocondrial em acetilcarnitina, que desempenha um papel na prevenção do acúmulo de grupos acetil que podem inibir o metabolismo energético mitocondrial, apoiando assim a vitalidade e a função espermáticas (JACYNO *et al.*, 2007).

Em búfalos foi observado que as propriedades antioxidantes da L-carnitina podem ajudar a proteger o espermatozoide contra danos oxidativos, que podem impactar sua morfologia, a integridade do DNA e a viabilidade. No contexto da criopreservação, a L-carnitina tem sido utilizada para melhorar a motilidade e a vitalidade dos espermatozoides durante o processo de congelação e descongelação. Seu papel no aumento da energética celular, facilitando o transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias foi associado à melhora do movimento flagelare de vários parâmetros do movimento espermático (BAHMYARI *et al.*, 2020).

Dentro das mitocôndrias, os ácidos graxos são oxidados no processo de β -oxidação, gerando energia na forma de ATP, que é indispensável para a motilidade flagelar dos espermatozoides. Foi observado que a L-carnitina é essencial nesse processo, pois atua como um transportador para esses ácidos graxos, permitindo a produção sustentada de energia (EL-SHAHAT *et al.*, 2018). A deficiência na disponibilidade de L-carnitina pode prejudicar a eficiência da β -oxidação, resultando em menor motilidade e desempenho espermático. Além de promover o transporte de ácidos graxos, a L-carnitina também contribui para a manutenção da integridade celular. Alguns autores relatam que, ao facilitar o metabolismo lipídico, a L-carnitina minimiza o acúmulo de EROs, que podem causar danos oxidativos aos lipídios da membrana plasmática dos espermatozoides (AGARWAL *et al.*, 2004).

Demonstrou-se também que, a suplementação de L-carnitina foi associada à melhora da sobrevivência, aumento da concentração e aumento da motilidade do espermatozoide durante o armazenamento do sêmen (NADA *et al.*, 2014). Além disso, estudos exploraram o potencial da L-carnitina para reduzir a toxicidade reprodutiva induzida por fatores como exposição ao chumbo, destacando seus efeitos protetores na qualidade do sêmen e na saúde reprodutiva masculina (MANEE-IN *et al.*, 2014). A L-carnitina também foi investigada por seu impacto na ultraestrutura do espermatozoide, níveis de estresse oxidativo e integridade do DNA, com descobertas sugerindo uma influência positiva nos parâmetros seminais e na proteção do DNA (ABDEL-EMAM & AHMED, 2021).

Em equinos com sêmen de baixa qualidade, a inclusão de L-carnitina pós-congelação promoveu ação antioxidante além de estimulador do metabolismo espermático, aumentando a taxa de fertilidade e sendo uma alternativa para cavalos com baixa qualidade seminal (LAGARES *et al.*, 2022). Já no sêmen equino refrigerado a 5°C, a inclusão de L-carnitina ao diluidor a base de leite preservou a motilidade por 48h (NERY *et al.*, 2020). Além dos resultados citados acima, outros autores conseguiram preservar o sêmen equino resfriado por 96h e também no sêmen congelado, favorecendo não apenas parâmetros cinemáticos de

motilidade total, progressiva, velocidade curvilínea, frequência de batimento cruzado, e também preservação das membranas plasmáticas e acrossomais, ao suplementar diluidores a base de leite com L-carnitina (PALACIOS *et al.*, 2024).

A L-carnitina desempenha um papel fundamental no metabolismo espermático, fornecendo energia facilmente por meio da β -oxidação, que influencia positivamente a motilidade (NERY *et al.*, 2020). Um estudo demonstrou que a L-carnitina melhora significativamente a motilidade, morfologia, concentração e níveis de testosterona do espermatozoide, indicando seu impacto positivo na qualidade do sêmen e na função reprodutiva masculina (MAHNAZ *et al.*, 2024). Outro estudo descobriu que o efeito benéfico da L-carnitina na motilidade espermática pós-congelação foi mais pronunciado em amostras com altos níveis endógenos de L-carnitina seminal em comparação com aqueles com níveis baixos (ILICETO *et al.*, 2024).

A inclusão da L-carnitina nos diluidores de sêmen equino pode prolongar a longevidade e a capacidade fertilizante dos espermatozoides (KARESKOSKI; KATILA, 2020).

4.3.4 DHA

O ácido docosahexaenóico (DHA) é um ácido graxo poliinsaturado (PUFA) da série ômega-3, possui 22 átomos de carbono e seis duplas ligações, o que permite maior fluidez da membrana plasmática influenciando diretamente a aquisição da motilidade dos espermatozoides e da reação acrossômica (ROOKE *et al.*, 2001; KOCHHAR, 2002; ASLAN *et al.*, 2014). Os PUFAs são essenciais para diversos processos biológicos, entre eles o crescimento geral, desenvolvimento do cérebro, visão e sistema reprodutivo, entretanto, os mamíferos não conseguem sintetizar ácidos graxos da família ômega 3 ou 6, devido à falta de enzimas dessaturase de ácidos graxos apropriadas, sendo, dessa forma necessário a suplementação dietética de ácido linoléico (C18:2 - ômega 6) e o ácido linolênico (C18:3 - ômega 3 (KOCHHAR, 2002).

O DHA é um dos principais ácidos graxos presentes na membrana plasmática dos espermatozoides, especialmente na cauda e na cabeça, sua presença contribui para a fluidez da membrana, essencial para processos como a capacitação e a reação acrossômica (CONNOR; NERINGUER, 1988). A incorporação adequada de DHA na membrana está associada a uma melhor motilidade espermática (FRANÇA *et al.*, 2021). Durante a espermatogênese o DHA tem participação para a formação dos espermatozoides, influenciando a composição lipídica dos testículos e do epidídimo. Níveis adequados de DHA garantem uma melhor morfologia espermática e um desenvolvimento adequado do acrossomo (RODRÍGUEZ-GARCÍA *et al.*,

2018; BUÑAY *et al.*, 2021). A fluidez da membrana conferida ao DHA melhora a flexibilidade da cauda do espermatozoide, o que favorece a motilidade e a progressão espermática. Foi observado que a deficiência de DHA está associada à redução da motilidade e danos ao DNA em espermatozoides humanos (MARTÍNEZ-SOTO *et al.*, 2016.)

Em diluidores de sêmen equino, o DHA é frequentemente incorporado devido aos seus benefícios na preservação da qualidade espermática durante os processos de refrigeração e congelamento (ASLAN *et al.*, 2014). Foi observado que o sêmen de garanhões utilizando a associação de 40 μM de Trolox[®] e 50 ngmL^{-1} de DHA ao BotuCrio[®] potencializa parâmetros de velocidade assim como, promove preservação de parâmetros cinemáticos, integridade estrutural e funcional, DNA, atividade mitocondrial, controle da peroxidação lipídica e longevidade dos espermatozoides (AGUIAR *et al.*, 2022).

Pesquisas indicam que o DHA, em conjunto com outros ácidos graxos ômega-3 como o EPA, pode impactar positivamente os parâmetros do sêmen e a capacidade antioxidante no plasma seminal (SAFARINEJAD, 2010). O DHA presente na membrana espermática é essencial para diversas funções espermáticas, incluindo motilidade, ligação com a zona pelúcida e fertilização (AGUIAR *et al.*, 2020). Estudos mostraram uma correlação positiva entre a proporção de PUFAs nas membranas espermáticas, especialmente DHA, e a qualidade do sêmen (GONZÁLEZ-RAVINA *et al.*, 2018).

A inclusão do DHA aos diluidores seminais de equino proporciona uma série de benefícios, atua como antioxidante indireto, reduzindo danos oxidativos nas membranas espermáticas e protegendo os espermatozoides contra a peroxidação lipídica que são produzidas em excesso durante a refrigeração e a congelamento do sêmen (MOURVAKI *et al.*, 2010). López-Fernández *et al.* (2014) demonstraram que a suplementação de DHA em diluidores equino melhora significativamente a integridade da membrana plasmática e a motilidade espermática durante a refrigeração a 5 °C por até 48 horas.

Durante o armazenamento, o DHA ajuda a preservar a fluidez da membrana, reduzindo a fragilidade e o risco de ruptura. Isso ocorre porque o DHA otimiza a função mitocondrial, essencial para a produção de energia necessária ao movimento espermático. Gibb *et al.* (2013) relataram que o DHA contribui para a manutenção da função mitocondrial dos espermatozoides equinos, melhorando a motilidade progressiva após o descongelamento. Aurich *et al.* (2020) destacaram o papel dos ácidos graxos poli-insaturados, incluindo o DHA, na melhora da qualidade do sêmen equino criopreservado, indicando que sua suplementação pode aumentar as taxas de concepção em inseminações artificiais. Aitken *et al.* (2012) relataram que ácidos graxos poli-insaturados como o DHA desempenham um papel essencial na função espermática,

ajudando a preservar a qualidade do sêmen mesmo em condições de estresse extremo, como a congelamento.

Foi observado que a suplementação de DHA demonstrou melhorar o status antioxidante seminal, reduzir a fragmentação do DNA dos espermatozoides e melhorar a qualidade do esperma. Estudos destacaram que a suplementação de DHA pode aumentar a composição de DHA no plasma seminal, enfatizando ainda mais seu papel na saúde reprodutiva masculina (MARTÍNEZ-SOTO *et al.*, 2016).

A presença de DHA nas membranas espermáticas aumenta a tolerância criogênica e ajuda a manter as propriedades fisiológicas da bicamada lipídica, crucial para a viabilidade do espermatozoide durante a criopreservação (FRANÇA *et al.*, 2021). Além disso, o DHA tem sido associado a melhorias na motilidade espermática, integridade da membrana e integridade do acrossoma no sêmen suíno quando usado sozinho ou em combinação com outros compostos em diluentes de congelamento (CHANAPIWAT & KAEOKET, 2021).

Os efeitos positivos dos ácidos graxos essenciais, particularmente o DHA, na espermatogênese, na maturação dos espermatozoides e em sua qualidade são amplamente reconhecidos (PARSLEY *et al.*, 2021). Estudos indicaram uma associação positiva entre o conteúdo de DHA no espermatozoide e a concentração espermática, contagem total, motilidade progressiva, vitalidade e morfologia normal, ressaltando a importância do DHA na fertilidade masculina (ILICETO *et al.*, 2022). Observou-se ainda que a suplementação de DHA restaura a fertilidade e a espermatogênese em camundongos machos, destacando ainda mais sua importância na função reprodutiva masculina (HAO *et al.*, 2022).

Pesquisas indicam que a suplementação dietética com DHA pode melhorar o status antioxidante seminal, reduzir a fragmentação do DNA do esperma e melhorar a função do espermatozoide (MARTÍNEZ-SOTO *et al.*, 2016). A suplementação oral de DHA potencializa parâmetros cinéticos dos espermatozoides, devido à sua influência na bioenergia mitocondrial e estabilidade das membranas flagelares (WATHES *et al.*, 2007). Além disso, a incorporação de DHA nas membranas espermáticas durante a espermatogênese afeta as propriedades físicas das membranas celulares, contribuindo para a liberação e função adequadas do espermatozoide (IIZUKA-HISHIKAWA *et al.*, 2017). O uso de DHA em diluidores de sêmen tem sido associado a resultados positivos na manutenção e reparo das membranas plasmáticas do esperma, reduzindo assim os danos às estruturas espermáticas (KAEOKET *et al.*, 2010). A inclusão de DHA em diluidores seminais de equino tem sido associada a benefícios na motilidade, viabilidade, integridade acrossômica e funcionalidade da membrana, especialmente durante a refrigeração e a congelamento (MURPHY *et al.*, 2016). Além disso, a combinação de

DHA com antioxidantes em diluidores demonstrou resultados promissores na preservação da qualidade do espermatozoide epididimal em touros, ressaltando os benefícios potenciais do DHA na saúde reprodutiva dos machos (LOSANO *et al.*, 2018). Os benefícios do DHA espermatozoide equino vão além das melhorias de qualidade.

A suplementação de DHA tem sido associada ao aumento da ligação do espermatozoide às células epiteliais do oviduto, uma etapa crítica na fertilização (LEEMANS *et al.*, 2016). Também é relatado que, a seleção de espermatozoides com maior teor de DHA por meio de técnicas de centrifugação antes da criopreservação demonstrou melhorar a qualidade do espermatozoide descongelado em garanhões, enfatizando a importância do DHA na preservação e fertilidade do sêmen (HOOGEWIJS *et al.*, 2011). A presença de DHA nas membranas espermáticas equinas foi associada à melhora da reação acrossômica do espermatozoide, integridade da membrana e integridade acrossômica, todas cruciais para uma fertilização bem-sucedida (CRAIG *et al.*, 2019).

Dessa forma, o DHA influencia significativamente a qualidade, a motilidade e a viabilidade do sêmen equino. Sua incorporação nas membranas espermáticas, suplementação em diluentes de sêmen e combinação com antioxidantes têm efeitos positivos nos parâmetros espermáticos e nos resultados reprodutivos em garanhões.

4.3.5 ERGOTIONEÍNA E CISTEAMINA

A congelação de sêmen equino é uma biotecnologia amplamente utilizada na reprodução animal, permitindo o armazenamento a longo prazo de material genético e a disseminação de características genéticas desejáveis em rebanhos ao redor do mundo. Esse processo, no entanto, enfrenta desafios significativos relacionados à redução da qualidade espermática durante a congelação e descongelação, incluindo danos oxidativos causados pelo estresse gerado pelo frio e pela formação de espécies reativas de oxigênio EROs. Esses danos podem comprometer a viabilidade e a funcionalidade dos espermatozoides, reduzindo a taxa de fertilização. Nesse contexto, o uso de antioxidantes tem se destacado como uma estratégia eficaz para minimizar os efeitos deletérios das EROs, protegendo as membranas celulares e o DNA dos espermatozoides contra o estresse oxidativo. Estudos indicam que a adição de compostos antioxidantes aos diluidores de sêmen equino pode melhorar a motilidade, integridade de membrana e capacidade fertilizante após a descongelação (FARLINI *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2018). Assim, a aplicação de antioxidantes no processo de criopreservação apresenta-se como uma abordagem promissora para aumentar a eficiência e a sustentabilidade dessa técnica reprodutiva.

A ergotioneína, um aminoácido natural, é conhecido por suas potentes propriedades antioxidantes e potenciais benefícios à saúde. Apesar de não ser sintetizada pelos animais, a ergotioneína é absorvida por fontes alimentares, sua absorção ocorre através de um transportador específico, novo transportador de cátions orgânicos (OCTN1) (POCHINI *et al.*, 2022), permitindo seu acúmulo em tecidos que sofrem altos níveis de estresse oxidativo, como fígado, rins, coração, pele e cérebro. Uma vez dentro das células, a ergotioneína exerce várias ações biológicas que protegem e melhoram a função celular, incluindo sua atuação como antioxidante e anti-inflamatório (NAOWAROJNA *et al.*, 2019; CHENG *et al.*, 2021). Este composto tem como alvo principal as mitocôndrias e desempenha um papel crucial na eliminação de EROs induzindo a proliferação celular e ativando mecanismos de reparo por meio de vias antioxidantes reguladas positivamente (MANNA *et al.*, 2019).

A ergotioneína também pode ser encontrada em equinos, presentes em fluidos extracorpóreos, como o sêmen. Em garanhões, a ampola do ducto deferente é o principal secretor de ergotioneína, em altas concentrações neste fluido biológico, entre 16,80 e 971,48 $\mu\text{mol/L}$ (SOTGIA *et al.*, 2020). A ergotioneína possui a capacidade de eliminar EROs e nitrogênio, exibindo propriedades de quelação de metais e regulando diretamente a atividade do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (TIAN *et al.*, 2023). A captação de ergotioneína pelas células endoteliais através do transportador OCTN-1 leva à proteção contra o estresse oxidativo, mitigando assim a disfunção endotelial (LI *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram que a suplementação de ergotioneína pode ter efeitos terapêuticos, particularmente em condições caracterizadas por estresse oxidativo, como pré-eclâmpsia (KERLEY *et al.*, 2018). Este aminoácido solúvel em água derivado inteiramente da dieta tem sido associado a vários benefícios à saúde, incluindo seu papel como antioxidante e sua distribuição em tecidos de mamíferos (TIAN *et al.*, 2021). As propriedades antioxidantes da ergotioneína a tornam um composto valioso no combate ao estresse oxidativo e na proteção das células contra danos causados por espécies reativas de nitrogênio, como o óxido nítrico (IZHAM *et al.*, 2022). Além disso, a ergotioneína tem sido associada a mecanismos antienvhecimento e à regulação de vias de defesa antioxidante envolvendo a proteína 1 associada à ECH semelhante a Kelch (KEAP1) e Nrf2 (CHEN *et al.*, 2023).

Em relação às biotecnologias de conservação de sêmen, a ergotioneína, um antioxidante natural, tem sido um assunto de interesse no campo da criopreservação. Estudos têm demonstrado que a ergotioneína desempenha um papel crucial na proteção do espermatozoide contra o estresse oxidativo e na melhoria da motilidade pós-descongelação em várias espécies animais (SALIH *et al.*, 2021; SUAREZ *et al.*, 2021; SHARAFI *et al.*, 2022), além de eliminar

as EROs e regular o metabolismo de ferro (NAJAFI *et al.*, 2014), garantir a integridade do DNA (ÇOYAN *et al.*, 2012; SALIH *et al.*, 2021), a integridade da membrana plasmática (ÇOYAN *et al.*, 2012), mantendo as funções e a viabilidade celular (KAEWMA *et al.*, 2024; LOBO *et al.*, 2024).

No sêmen equino foi observado que a ergotioneína, sozinha ou em associação com outros antioxidantes, reduziram parâmetros cinemáticos como a VCL e a ALH, mas não comprometeram a funcionalidade de membrana e a capacidade de fertilização *in vitro* do sêmen equino congelado-descongelado (LOBO *et al.*, 2024). No sêmen de galo fresco e congelado, foi avaliado o efeito da ergotioneína em diferentes concentrações (0, 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08, 0,1, 0,5, 1 e 5 mmol). Para o sêmen fresco as doses de ergotioneína superiores a 0,5 mmol tiveram efeitos negativos significativos na pontuação de vigor espermático e na integridade da membrana. As doses mais baixas não afetaram esses parâmetros. Já no sêmen congelado-descongelado, as doses maiores que 0,06 mmol diminuíram os valores de vigor e a dose maior que 0,08 diminuiu a integridade da membrana. Além disso, todas as doses de ergotioneína testadas maiores que 0,08 mmol foram severamente prejudiciais ao espermatozoide (THANANURAK *et al.*, 2020). No sêmen canino congelado, a ergotioneína foi testada nas seguintes concentrações, 50 μ M, 100 μ M ou 150 μ M e provado que na concentração de 100 μ M houve redução das EROs, redução alterações deletérias e estresse oxidativo ao espermatozoide (USUGA *et al.*, 2021). No sêmen ovino congelado, a ergotioneína em doses de 2 e 4 mM aumentou as porcentagens de motilidade subjetiva, VSL e VCL. Foi observado que a inclusão de ergotioneína ao diluente promoveu melhores resultados para os parâmetros cinéticos mas não apresentou diferença nos parâmetros de integridade de membrana e atividade mitocondrial (COYAN *et al.*, 2011).

Essas descobertas ressaltam o potencial da ergotioneína como um componente valioso em técnicas de preservação do sêmen para manter a viabilidade e funcionalidade do sêmen. Foi observado também que a ergotioneína demonstrou minimizar os danos ao DNA no sêmen ovino pós-descongelado, reforçando ainda mais seu papel na proteção da integridade espermática durante a criopreservação (ÇOYAN *et al.*, 2012).

Os mecanismos de proteção da ergotioneína podem ser explicados através da mitigação de danos induzidos por estresse oxidativo, como evidenciado por sua capacidade de eliminar radicais de oxigênio e regular o metabolismo do ferro (NAJAFI *et al.*, 2014). Além disso, descobriu-se que a ergotioneína melhora a qualidade do sêmen de carneiro criopreservado quando usada em combinação com outros agentes crioprotetores como a cisteamina (KORDAN *et al.*, 2013). Em um contexto mais amplo, a ergotioneína faz parte de um grupo de substâncias

de baixo peso molecular, incluindo L-glutationa e ácido L-ascórbico, que contribuem para proteger o espermatozoide de danos induzidos por espécies reativas de oxigênio. Esses antioxidantes, juntamente com antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutase e glutaciona peroxidase, formam um sistema de defesa abrangente contra o estresse oxidativo (PINTUS; ROS-SANTAELLA, 2021).

Em conclusão, a ergotioneína surge como um antioxidante promissor com implicações significativas para a biologia do sêmen e criopreservação. Sua capacidade de proteger os espermatozoides de danos oxidativos, melhorar a motilidade e a qualidade da amostra depois da descongelação, o que ressalta seu potencial como um componente valioso em estratégias de preservação de sêmen em várias espécies animais.

A cisteamina (C_2H_7NS) é um composto organossulfurado, derivado da degradação da cisteína. Quimicamente, é constituído por uma amina primária ($-NH_2$) e um grupo tiol ($-SH$), conferindo-lhe propriedades redutoras e capacidade de interagir com outras biomoléculas, especialmente compostos sulfurosos. A presença do grupo tiol ($-SH$) permite que a cisteamina atue na modulação redox, interagindo com outros compostos sulfurosos e influenciando processos celulares. Esse grupo é crucial para seu papel terapêutico, especialmente no tratamento de doenças relacionadas ao metabolismo de cistina (PISONI *et al.*, 1995). A cisteamina reage com a cistina, formando um complexo de cisteamina-cisteína que pode ser transportado para fora dos lisossomos, reduzindo a toxicidade celular (GAHL *et al.*, 2002). A cisteamina também participa da homeostase redox, auxiliando da redução das EROs e protegendo contra estresse oxidativo. Foi observado efeitos neuroprotetores, por sua ação em modular a função de proteínas como a glutaciona peroxidase (CHEREST *et al.*, 2020).

A cisteamina atua como precursor na síntese de glutaciona, um antioxidante intracelular crucial para a proteção celular contra danos oxidativos, ao aumentar os níveis de glutaciona, contribui para a neutralização de EROs, protegendo os espermatozoides contra danos oxidativos que podem afetar sua viabilidade e função (CROCOMO *et al.*, 2012). No contexto dos espermatozoides, a cisteamina pode influenciar sua funcionalidade por meio de mecanismos relacionados ao estresse oxidativo e ao metabolismo energético. Estudos indicam que a cisteamina pode modular a atividade de enzimas glicolíticas nos espermatozoides, como a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase-S (GAPDH-S). A inibição dessa enzima pode afetar a produção de energia necessária para a motilidade espermática, comprometendo a capacidade dos espermatozoides de se movimentarem adequadamente (PAIVA, 2010).

Devido ao seu potencial antioxidante, a cisteamina tem sido estudada em espermatozoides durante o processo de criopreservação. No entanto, pesquisas indicam que a

inclusão de cisteamina em diluidores de sêmen pode não ser benéfica e, em alguns casos, pode até reduzir a qualidade espermática. Santana et al. (2024) avaliaram a adição de ergotioneína e cisteamina em diluidores de criopreservação de sêmen equino e observou uma redução expressiva nos parâmetros de qualidade espermática. A inclusão da cisteamina em diluentes para congelamento também foi avaliada em sêmen ovino e observado que essa associação pode trazer impactos negativos para o espermatozoide (COYAN *et al.*, 2011). No sêmen congelado de galos, mesmo em doses baixas, a cisteamina reduziu a peroxidação lipídica, porém reduziu também a viabilidade celular, comprometendo a fertilidade do espermatozoide (THANANURAK *et al.*, 2020).

Por fim, a cisteamina mostra-se promissora em melhorar a funcionalidade do sêmen e os processos de fertilização devido às suas propriedades antioxidantes, no entanto mais pesquisas ainda são necessário afim de encontrar concentrações que preservem o espermatozoide criopreservado.

4.3.6 ROSIGLITAZONA

Rosiglitazona é um medicamento pertencente à classe das glitazonas e é utilizado no tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (SWENGE *et al.*, 2016). Seu mecanismo de ação é agir como sensibilizador de insulina em seres humanos, aumentando a sensibilidade à insulina nos tecidos-alvo (HALLSTEN *et al.*, 2002) e proporcionando a produção de glicose pelo fígado, além de garantir a restauração da flexibilidade metabólica (HORAKOVA *et al.*, 2012), pois aumenta a captação celular de glicose (LENNON *et al.*, 2016). Este medicamento é utilizado para ajudar a controlar os níveis de açúcar no sangue em pacientes com diabetes tipo 2, contribuindo para melhorar o controle glicêmico, por regular a glicose no sangue e reduzir complicações associadas à doença (SILVA *et al.*, 2018). No entanto, seu uso pode estar associado a efeitos adversos, como toxicidade cardiovascular, ganho de peso e retenção de líquidos, que limitam sua utilização em alguns casos (MOTTIN; SKAF, 2012).

Após a criopreservação, os espermatozoides apresentam redução do consumo de oxigênio mitocondrial, provocando atividade mitocondrial prejudicada devido ao estresse oxidativo e ao dano osmótico durante a criopreservação (DARR *et al.*, 2016). Assim, os espermatozoides criopreservados apresentam menor motilidade e menor teor de ATP comprometendo sua funcionalidade e por fim sua capacidade fertilizante. A suplementação de rosiglitazona ao meio diluidor mantém a fosforilação, promove melhora da funcionalidade

mitocondrial e aumento da atividade glicolítica de espermatozoides equinos (ORTIZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

Foi investigado os efeitos da rosiglitazona no sêmen de carneiro após criopreservação e observado que na concentração de 60 μM adicionado ao diluente, promoveu aumento da motilidade total, motilidade progressiva, velocidade em linha reta, velocidade média do caminho e velocidade curvilínea. Também houve melhora da funcionalidade de membrana e aumento da atividade mitocondrial. No entanto, ao aumentar a concentração para 80 μM não foi observado resultados satisfatório, demonstrando maior eficiência em doses menores (MEHDIPOUR *et al.*, 2022). No sêmen de touros, a rosiglitazona promoveu manutenção em espermatozoides congelados-descongelados por 24 horas em temperatura ambiente (AGOSTINI LOSANO *et al.*, 2024).

5. ARTIGO I

ARTIGO DE BIOTECNOLOGIA

Análise funcional de espermatozoides equino congelados com meio BWW e associação de DHA e Rosaglitazona

Artigo redigido e submetido segundo as normas da Animal Reproduction/ Qualis A2/ Fator de Impacto : 1.6/(ISSN 1984-3143)

ARTIGO DE BIOTECNOLOGIA

Análise funcional de espermatozoides equino congelados com meio BWW e associação de DHA e Rosaglitazona

Larissa Rodrigues Santana^{1*}(<https://orcid.org/0000-0001-9176-6324>), William Morais Machado² (<https://orcid.org/0000-0002-0134-1478>), Luciano Cardoso Santos³ (<https://orcid.org/0000-0001-7679-1353>), Tainá Hortência Pessoa¹(<https://orcid.org/0000-0003-1516-7412>), Ivan Bezerra Allaman¹(<https://orcid.org/0000-0003-0883-0466>), Larissa Pires Barbosa⁴(<https://orcid.org/0000-0002-1473-4991>), Rodrigo Freitas Bittencourt⁵ (<https://orcid.org/0000-0002-0341-2073>), Paola Pereira das Neves Snoeck¹ (<https://orcid.org/0000-0003-4445-8630>)

¹ Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, Km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

² Faculdade de Irecê, 44873-030, Irecê, Bahia, Brasil.

³ Centro de Microscopia Eletrônica (CME), Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, Km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

⁴ Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 44.380-000Cruz das Almas, BA, Brasil

⁵ Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 40170-110, Salvador, Bahia, Brasil.

* Correspondência: Larissa Rodrigues Santana, larirodriguesvet@gmail.com, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, Km 16, 45662-900, Ilhéus, Bahia, Brasil.

RESUMO

Trata-se de um estudo inédito, em que o objetivo foi a confecção de um novo diluidor de congelamento de sêmen, a partir de modificações do meio descrito por Biggers, Whitten e Whittingham (1971) - BWW, com o intuito de aumentar a viabilidade espermática *in vitro* de

forma a garantir potencial fecundante dos espermatozoides criopreservados. Para a realização deste experimento, foram coletados sete ejaculados de cinco garanhões Mangalarga Marchador por meio de vagina artificial. O sêmen coletado foi diluído 1:2 em BotuSêmen® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e centrifugado a 12000xG/10 min. O sobrenadante foi desprezado e a concentração do pellet determinada em câmara de Neubauer. O pellet foi diluído para testar: D1) BotuCrio®; D2) BWW(I) + 10% de LDL + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; D3) BWW(II) + 10% de LDL + 30ng/mL⁻¹ de DHA + 50 µM de ROSI + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; D4) BWW(II) + 30ng/mL⁻¹ de DHA + 50 µM de ROSI + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida (BWWII-vegano), de forma a obter 100 x 10⁶ espermatozoides/mL. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, devidamente identificadas e submetidas ao seguinte protocolo de criopreservação em sistema automatizado Neovet Cryogen HSE® portátil (Uberaba, Brasil): curva de refrigeração de de -0,8 °C por minuto de 20,5 °C até 5 °C, seguido de 10 minutos de equilíbrio na temperatura de 5 °C por, em seguida, as palhetas foram congeladas com taxa de -20 °C/min na rampa 1 e -40 °C/min na rampa 2 até atingir -100°C, com posterior imersão das palhetas em nitrogênio líquido (-196 °C) para finalizar o processo de congelamento. A descongelamento foi realizada com imersão das palhetas em banho-maria a 46 °C/20 segundos. Concluímos que a adição de DHA e Rosiglitazona nas concentrações estudadas foi eficaz em preservar alguns atributos celulares importantes como integridade estrutural de membrana, atividade mitocondrial e compactação, no entanto, mais pesquisas precisam ser realizadas a fim de encontrar concentrações mais adequadas para preservar os parâmetros de cinética espermática.

Palavras-chave: Criopreservação; Garanhão; Lipoproteína de baixa densidade; Ômega; Rosiglitazona.

1 INTRODUÇÃO

A comercialização de doses de sêmen de garanhões de alto valor econômico e zootécnico é o principal pilar na indústria equina, sendo a inseminação artificial a tecnologia reprodutiva mais difundida, que, além disso, constitui a base para a transferência de embriões e produção *in vitro* de embriões (PEÑA *et al.*, 2024). A criopreservação de espermatozoides é um processo amplamente utilizado na reprodução equina, no entanto pode causar alguns impactos negativos na viabilidade e funcionalidade do sêmen. Entre os principais efeitos da congelação e descongelação, destacam-se: danos estruturais à membrana do espermatozoide, comprometendo sua integridade e viabilidade (MEDEIROS *et al.*, 2002), redução da motilidade, devido ao estresse térmico e osmótico sofrido pelas células (DI SANTO *et al.*, 2012), aumentar os níveis de estresse oxidativo, levando à fragmentação do DNA espermático, o que pode impactar negativamente a fertilização e o desenvolvimento embrionário (Donnelly *et al.*, 2001), alterações da função mitocondrial (MARTÍNEZ-SOTO *et al.*, 2016) e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) causando maior risco de lesões sobre a integridade do espermatozoide e afetar sua funcionalidade (AITKEN; CLARKSON, 1987).

Além disso, a congelação de sêmen equino pode comprometer sua produção, como por exemplo: redução da fertilidade, uma vez que a viabilidade no espermatozoide congelado é menor do que o fresco, devido sua baixa longevidade pós-descongelação; maior custo com mão-de obra especializada e animais de alto valor; maior custo de logística relacionados ao transporte e manutenção de botijões criogênicos (MORRIS; HARTEVELD; GIBB, 2024).

Outro ponto sensível é que espermatozoides equinos possuem membrana plasmática com alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados, condição que os torna ainda mais sensíveis aos danos oxidativos das espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas como subprodutos do metabolismo celular (MEDICA *et al.*, 2021). Para garantir o sucesso no processo de criopreservação a fim de evitar e/ou minimizar os danos celulares aos

espermatozoides, muitos estudos têm sido realizados a fim de se obter uma formulação de um diluidor de sêmen ideal que garanta a proteção contra o choque frio e forneça aporte energético para manutenção da viabilidade espermática em condições desfavoráveis (AGUIAR *et al.*, 2020; BAHRAMI *et al.*, 2020; ORTIZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2021).

Os meios utilizados para a diluição do sêmen para a criopreservação são compostos por substâncias que atuam contra os efeitos deletérios das oscilações da temperatura. Dentre os principais componentes das formulações estão a gema de ovo, leite desnatado, açúcares, eletrólitos e glicerol (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A gema de ovo é uma fonte lipídica com capacidade de proteger o espermatozoide contra o choque frio, porém, sua composição pode variar de acordo com alguns fatores como nutrição, idade e linhagem do animal podem alterar a composição de lipídeos (SCHEIDELER *et al.* 1998). Dessa forma um componente mais específico da gema do ovo, as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), vêm sendo utilizadas em processos de congelação de sêmen (CONSUEGRA *et al.*, 2019).

No entanto, uma importante preocupação com o uso de constituintes de origem animal na formulação de diluidores é o risco sanitário, uma vez que o transporte de material genético pode favorecer a proliferação e disseminação de microorganismos patológicos (PAPA; FELICIO, 2011) além de não apresentarem uma composição quimicamente definida (PLANTE *et al.*, 2015). Dessa forma, a confecção de diluidores quimicamente definidos pode oferecer maior segurança biológica e garantir um meio com composição padronizada. Um meio quimicamente definido, descrito por Biggers, Whitten e Whittingham (BWW) modificado por Gibb *et al.* (2015), através da adição de L-carnitina e Piruvato de Sódio, testado em sêmen equino, em temperatura ambiente, mostrou manutenção dos valores cinemáticos por 72 horas em relação aos meios tradicionais. Entretanto, este meio ainda não foi confeccionado para a utilização em processos de criopreservação como a congelação.

Para promover um ambiente favorável à sobrevivência do espermatozoide durante a passagem da temperatura ambiente até as faixas baixas, é necessária a inclusão de substâncias que possam fornecer estabilização da membrana, energia para o metabolismo celular, evitar a desidratação severa, peroxidação lipídica, e a formação de ROS (GIBB *et al.*, 2015). O ácido docosahexaenoico (DHA) é um ácido graxo poliinsaturado (PUFAs) presente na membrana do espermatozoide (STEVEN *et al.*, 2005). Dentre os benefícios na adição do DHA em diluentes seminais temos: melhora da integridade da membrana espermática, uma vez que o DHA é um dos seus principais componentes lipídicos e ajuda a manter sua fluidez e resistência ao estresse térmico e osmótico durante a criopreservação (LEITE *et al.*, 2023), aumento da motilidade pois está envolvido na regulação da fluidez da membrana e na eficiência da mitocôndria (GHOLAMI; CHAMANI, 2017), redução do estresse oxidativo atuando como um antioxidante natural, reduzindo os danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem levar à fragmentação do DNA espermático e diminuir a viabilidade celular (MALDJIAN *et al.*, 2005) além de promover proteção ao material genético contra fragmentação, garantindo a fertilidade do espermatozoide (AITKEN *et al.*, 2012). Foi observado que a suplementação com DHA levou a aumento dos valores de cinética espermática, motilidade total e motilidade progressiva (BRISKO *et al.*, 2005), sugerindo que o uso de DHA aos meios de congelação pode garantir a proteção da membrana e viabilidade celular.

Além de DHA, os efeitos da rosiglitazona, uma substância antidiabética (SWENGE *et al.*, 2016) que promove melhora a sensibilidade à insulina (HALLSTEN *et al.*, 2002), têm sido testados como suplementação sêmen. Após o processo de congelação, os espermatozoides apresentam menor motilidade e menor teor de ATP comprometendo sua funcionalidade e por fim sua capacidade fertilizante. A suplementação de rosiglitazona ao meio diluidor mantém a fosforilação, promove melhora da funcionalidade mitocondrial e aumento da atividade glicolítica de espermatozoides equinos (ORTIZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

A incubação espermatozoides equinos com rosiglitazona promoveu maior qualidade espermática, sobretudo por aumentar a motilidade, o conteúdo de ATP e a capacidade de captação de glicose (SWEGEN *et al*, 2016). Quando foi adicionada em meio pós-congelação, a rosiglitazona também melhorou a funcionalidade mitocondrial, aumentou a atividade glicolítica, manteve a fosforilação da proteína quinase B (Atk) e reduziu a ativação da caspase 3, em espermatozoides equinos (ORTIZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019).

Ainda não existem estudos avaliando a funcionalidade do espermatozoide equino criopreservado em meio quimicamente definido e enriquecido com essas substâncias. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar se o diluidor quimicamente definido e sanitariamente controlado, produzido com a formulação BWW enriquecido com DHA, rosiglitazona e LDL tem a capacidade de maximizar a qualidade do sêmen congelado de garanhões, e garantir parâmetros espermáticos importantes para o processo de fecundação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL E ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal CEUA/UESC da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil com o número de protocolo 004/16.

Foram utilizados cinco garanhões Mangalarga Marchador, com idade entre 5 a 8 anos, considerados aptos à reprodução por meio do exame andrológico, posterior ao esgotamento das suas reservas espermáticas extragonadais por meio de coletas de sêmen seriadas por pelo menos sete dias com vagina artificial modelo Botucatu® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e auxílio de uma fêmea em estro como manequim, seguido de um período de descanso de 48 horas, apresentando as seguintes características seminais de volume entre 40 e 60 ml, cor branca acinzentada, odor *sui generis*, motilidade espermática $\geq 30\%$, vigor ≥ 3 , espermatozoide

morfologicamente normais $\geq 60\%$, parâmetros seminais característicos segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (2013).

A coleta e congelamento de sêmen foram conduzidas em um haras localizado no município de Itambé, Latitude: -15.2454, Longitude: -40.6243, 15° 14' 43" Sul, 40° 37' 27", Oeste região Sudoeste do Estado da Bahia – Brasil, durante a estação reprodutiva, entre os meses de fevereiro e março. Todas as amostras foram descongeladas e analisadas no Laboratório de Reprodução Animal (LARA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

2.2 COLETA DO SÊMEN E AVALIAÇÃO

A coleta de sêmen foi realizada utilizando vagina artificial apropriada, modelo Botucatu®, usando éguas em estro induzido com Cipionato de estradiol (E.C.P.®; 4mg/kg/ via intramuscular), como manequim. Após a coleta, a fração gel dos ejaculados foi filtrada e o sêmen avaliado de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas: volume, cor, odor, aspecto, motilidade total (MT) motilidade progressiva (MP) e vigor espermático, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (2013). Com posterior diluição de uma alíquota do sêmen em citrato de sódio formolizado a 4% (1:20), para determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer e da morfologia espermática pela técnica de preparação úmida, com avaliação de 200 espermatozoides.

2.3 CONFECÇÃO DE DILUIDORES

2.3.1 EXTRAÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE (LDL)

Para a extração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) utilizou-se o protocolo descrito por Moussa et al. (2002), com adaptações. O relatório da extração utilizado está descrito no apêndice.

2.3.2 CONFEÇÃO DE DILUIDORES

O diluidor quimicamente definido do tipo BWW (BIGGERS *et al.*, 1971 com modificações citadas por GIBB *et al.*, 2015), utilizado no presente estudo, apresentou duas diferentes composições. A primeira formulação apresentou os seguintes componentes: 95 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,7 mM CaCl₂ .2 H₂O, 1,2 mM KH₂ PO₄, 1,2 mM MgSO₄. 7 H₂O, 25 mM NaHCO₃, 5,6 mM glicose, 275 µM piruvato de sódio, 3,7 µL/mL 60% lactato de sódio, U/ml de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, 250 µg/mL de gentamicina, 20 mM de HEPES e 0,1% (p/v) álcool polivinílico, constituindo o diluidor BWW-I. A segunda formulação teve as seguintes modificações: redução da concentração de NaCl (80,14%), suplementação de 10 mM de piruvato de sódio na concentração final da solução e adição de 50 mM de L-carnitina (componente ausente no BWW-I), constituindo o diluidor BWW-II. Os diluidores apresentaram 1002,00 mOsmol/L de osmolalidade e 7,2 de pH.

Os grupos experimentais foram compostos pelos seguintes diluidores de congelamento: D1) diluidor à base de gema de ovo (BotuCrio®); D2) BWW-I + 10% de LDL + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; D3) BWW-II + 10% de LDL + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida + 30 ng/mL⁻¹ de DHA + 50 µM de ROSI; D4) BWW-II + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida + 30ng/mL⁻¹ de DHA + 50 µM de ROSI (BWW-II).

2.3.3 CONGELAÇÃO DE SÊMEN

Os ejaculados coletados foram diluídos na proporção de 1:2 (v/v) em diluidor a base de leite (GIBB *et al.*, 2015) e centrifugados a 12000x G por 10 min. O sobrenadante foi desprezado depois da centrifugação e a concentração do pellet determinada em câmara de Neubauer. O pellet foi ressuspensão nos diluidores testes: D1) diluidor à base de gema de ovo (BotuCrio®); D2) BWW-I + 10% de LDL + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; D3) BWW-II + 10%

de LDL + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida + 30 ng/mL⁻¹ de DHA + 50 µM de ROSI; D4) BWW-II + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida + 30ng/mL⁻¹ de DHA + 50 µM de ROSI (BWW-II) de forma a obter 100x10⁶ espermatozoides/mL.

O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL e submetidas a criopreservação em sistema automatizado Neovet Cryogen HSE[®] portátil (Uberaba, Brasil), utilizando a seguinte curva: curva de refrigeração de - 0,8 °C por minuto da temperatura inicial de 25°C até 5 °C, seguido de 10 minutos de equilíbrio na temperatura 5 °C por, em seguida, as palhetas foram congeladas com taxa de -20 °C/min na rampa 1 e -40 °C/min na rampa 2 até atingir -100°C, com posterior imersão das palhetas em nitrogênio líquido (-196 °C) para finalizar o processo de congelação. A descongelação foi realizada com imersão das palhetas em banho-maria a 46 °C/20 segundos.

2.4 ANÁLISES ESPERMÁTICAS

2.4.1 CINEMÁTICA

O movimento espermático das amostras descongeladas foi avaliado por sistema computadorizado Sperm Class Analyser[®] - CASA (SCA evolution, Microptics S.L, Barcelona, Espanha). As amostras foram preparadas 5 minutos depois da descongelação em lâmina Leja 20 µm. Os padrões utilizados para o ajuste do equipamento seguiu o indicado no setup para análise de sêmen equino: 25 imagens/seg com 25 Hertz (Hz); tamanho de partícula capturado entre 4 e 75 µm/m²; espermatozoides considerados imóveis <10 µm/s, lentos <45 µm/s, médios de 45 a 90 µm/s e rápidos >90 µm/s. Foram avaliados os seguintes parâmetros: motilidade total (MT;%), motilidade progressiva (MP; %), linearidade (LIN; %), retilinearidade (STR; %), velocidade curvilínea (VCL; µm/s), velocidade linear progressiva (VSL; µm/s), velocidade média do trajeto (VAP; µm/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH; µm), e frequência do batimento flagelar cruzado (BCF; Hz).

2.4.2 INTEGRIDADE FUNCIONAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pela determinação do percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST) depois da diluição de 50 µL da amostra em 500 µL de solução de sacarose a 100 mOsmol/L. As amostras foram incubadas em banho seco a 37°C durante 30 min e posteriormente fixadas com 250 µL de solução de citrato de sódio formolizado a 4%, seguida de avaliação de 200 células em microscópio de contraste de fase (1000x; Olympus® CX 31). A porcentagem de células funcionalmente íntegras foi calculada da seguinte forma: $HOST\% = \% \text{ de alterações na região da cauda após o HOST} - \% \text{ de alterações na região da cauda antes do HOST}$, de acordo com o método de Melo e Henry (1999). As alterações de cauda antes e depois da incubação, em solução hiposmótica, foram analisadas por meio da técnica de preparação úmida.

2.4.3 INTEGRIDADE ESTRUTURAL DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL

A integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal das amostras de sêmen descongeladas foi avaliada em microscópio fluorescente (400x; Nikon® 550S) usando os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) de acordo com o método de Harrison e Vickers (1990). A coloração com CFDA foi avaliada usando o conjunto padrão de filtro de fluoresceína, enquanto a coloração com IP foi avaliada usando o conjunto padrão de filtros de rodamina. Foram analisados 100 espermatozoides por amostra. Os espermatozoides foram classificados como viáveis aqueles estruturalmente íntegros, com membrana plasmática e acrossomal intactas (CFDA+/ IP-).

2.4.4 INTEGRIDADE DA CROMATINA

A integridade da cromatina espermática em amostras de sêmen descongelada foi avaliada pela técnica da metacromasia induzida pelo azul de toluidina (NAVES *et al.*, 2004). Foram confeccionados esfregaços com uma alíquota de 10 μ L da amostra, secados em temperatura ambiente e fixados por 1 min em solução de Carnoy (3:1, 75 mL de álcool 100 % + 25 mL de ácido acético) e em seguida em álcool a 70 % por 3 min. Procedeu-se á hidrólise com ácido clorídrico 4N por 15 minutos, lavagem em água destilada e secagem em temperatura ambiente. Para a coloração do esfregaço foram depositados 20 μ L da solução de azul de toluidina a 0,025 % (0,00125 g de azul de toluidina em 5 mL de solução de McIlveine, pH 4,0) entre lâmina e lamínula e avaliados 200 espermatozoides em microscopia de contraste de fase (1000x; Olympus® CX 31). Os espermatozoides foram classificados com cromatina compacta (região da cabeça corada em azul claro) e com cromatina descompactada (região da cabeça corada em azul escuro ou violeta). Foram considerados viáveis aqueles espermatozoides com cromatina compacta.

2.4.5 ATIVIDADE MITOCONDRIAL

A atividade mitocondrial foi avaliada depois da descongelação do sêmen, por meio da coloração de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) segundo a técnica de Hrudka (1987), sendo que 20 μ L da amostra será incubada com 20 μ L de DAB (1mg/mL de PBS) a 37 °C por 60 minutos, na ausência de luz. Após a incubação foram confeccionados esfregaços, fixados em formol a 10 % por 10 minutos, lavados em água destilada e secados ao ar sob proteção da luz. Foram avaliados 200 espermatozoides em microscópio de contraste de fase (1000x; Olympus® CX 31) e classificadas de acordo com o nível de deposição do corante na peça intermediária (PI). Na classe I, os espermatozoides que apresentarem a peça intermediária totalmente corada (alta atividade mitocondrial); na classe II, mais de 50 % da peça intermediária corada (atividade

mitocondrial intermediária); na classe III, menos de 50 % da peça intermediária corada (baixa atividade mitocondrial) e na classe IV, não apresentarem coloração (atividade mitocondrial inexistente).

2.4.6 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A morfologia espermática foi avaliada em amostras de sêmen pré-congelação e descongeladas pela técnica de preparação úmida. Para a avaliação uma alíquota de 10µl de sêmen foi adicionada a 490 µl de PBS formolizado a 4% tamponado previamente aquecido a 37°C. Foram analisadas 200 células em um microscópio de contraste de fase, sob óleo de imersão (1000x; Olympus® CX 31). As anormalidades morfológicas foram classificadas de acordo com células normais, defeito maior e defeito menor, de acordo com o Manual de Exame Andrológico (CBRA, 2013).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, considerado o ejaculado como bloco. Para a comparação do efeito dos diluidores foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida de comparações múltiplas de médias foi utilizado a função Tukey C versão 1.3-4 (FARIA; JELIHOVSCHI; ALLAMAN,2021). Os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram realizados para verificar a normalidade e homocedasticidade dos resíduos. Variáveis que não atenderam os pressupostos passaram por transformação boxcox. Os parâmetros de motilidade, espermatozoides rápidos e lentos precisaram ser comparados pelo teste não paramétrico de Friedman. Todas as análises foram feitas pelo programa Tinn-R versão 8.1.3.4 e os gráficos usando o programa GraphPad prism versão 9.5.0 (730). As hipóteses testadas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

Os ejaculados utilizados para testar os diferentes diluidores para a congelação apresentaram características macroscópicas típicas de sêmen equino fresco, motilidade total média de 80,7%, motilidade progressiva média de 77,1%, vigor 3 e espermatozoides morfologicamente normais de 69,6%. Todos os ganhões foram considerados aptos para reprodução na avaliação andrológica, no entanto, não houve seleção para congelabilidade.

Os diluidores BWW para congelação de sêmen preservaram os parâmetros espermáticos rápidos, VCL, STR, ALH, a integridade estrutural, a compactação de DNA e a atividade mitocondrial de forma semelhante ao diluidor à base de gema de ovo ($P > 0,05$). O meio BWW, independente de sua formulação, foi inferior ao meio contendo gema de ovo para preservar a motilidade (MT e MP), o percentual de espermatozoides lentos e a funcionalidade da membrana plasmática ($P < 0,05$). A formulação BWW-II, contendo L-Carnitina, com ou sem LDL resultou em percentual de espermatozoides com velocidade média, VAP, VSL, LIN e percentual de espermatozoides morfologicamente normais inferior quando comparado ao sêmen congelado em meio com gema de ovo ($P < 0,05$) e resultou em maior percentual de alterações morfológicas classificadas em defeitos maiores ($P < 0,05$). Os espermatozoides congelados em BWW-II sem LDL apresentaram BCF inferior aos criopreservados em meio contendo gema de ovo ($P < 0,05$) e maior percentual de espermatozoides com alterações morfológicas consideradas defeitos menores ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Os diluidores BWW para congelação de sêmen preservaram os parâmetros de percentual de espermatozoides rápidos, VCL, STR, ALH, a integridade estrutural, a compactação de DNA e a atividade mitocondrial de forma semelhante ao diluidor contendo gema de ovo ($P > 0,05$). No entanto, apresentaram redução do potencial de preservar os parâmetros de motilidade e

espermatozoides funcionalmente íntegros quando comprados ao meio à base de gema de ovo ($P < 0,05$). Além disso, o diluidor à base de gema de ovo também foi superior aos diluidores BWW contendo L-carnitina na sua formulação, com ou sem LDL para preservar a VAP, VSL, linearidade e percentual de morfologicamente normais ($P < 0,05$).

Durante o processo de congelamento e descongelamento, ocorre lesão da membrana plasmática do espermatozoide, impactando significativamente os parâmetros de cinética espermática, como a motilidade, a velocidade e o padrão de movimento dos espermatozoides. Essa lesão pode ocorrer devido a vários fatores, como a formação de cristais de gelo dentro das células, mudanças na composição lipídica da membrana e danos oxidativos, entre outros. A membrana plasmática dos espermatozoides é crucial para a sua funcionalidade, já que ela regula a interação do espermatozoide com o ambiente extracelular e controla processos essenciais, como a capacitação e a fusão com o oócito (MAZUR, 2004).

A lesão da membrana plasmática do espermatozoide durante o processo de congelamento e descongelamento pode ser explicada por vários mecanismos moleculares e celulares. Esses mecanismos são complexos e envolvem interações entre as estruturas celulares, as condições físicas (como a temperatura) e os processos bioquímicos desencadeados durante a congelamento e a descongelamento. O citoesqueleto do espermatozoide é crucial para a sua motilidade, fornecendo suporte estrutural para o flagelo e para a transmissão de sinais necessários para a locomoção. O estresse térmico e mecânico pode desestruturar as fibras do citoesqueleto, como a tubulina e a actina, que são essenciais para o movimento do flagelo. Isso pode reduzir a capacidade do espermatozoide de nadar de forma eficaz.

Outro fator que pode estar associado é a desregulação dos níveis de cálcio. O cálcio é fundamental para o movimento do espermatozoide, e a desregulação dos níveis intracelulares de cálcio pode afetar a capacidade do flagelo de gerar movimento, resultando em motilidade reduzida ou irregular. Durante a congelamento e descongelamento, a função das bombas iônicas que

regulam os níveis de cálcio intracelular pode ser comprometida. O aumento dos níveis de cálcio intracelular pode ativar enzimas como as fosfolipases e proteases, que podem causar danos à membrana e outras estruturas celulares (MARCONATO *et al.*, 2022).

O estresse causado pela congelação pode ativar vias apoptóticas, como a via da caspase, resultando na morte celular dos espermatozoides danificados. Esses mecanismos moleculares explicam como a lesão da membrana plasmática pode afetar a motilidade e outras funções essenciais dos espermatozoides após a descongelação, comprometendo suas chances de fertilizar um oócito e afetando a eficácia dos tratamentos de reprodução assistida.

Observamos em nosso estudo que o diluente BWW contendo LDL não foi eficaz em preservar atributos celulares importantes. Uma hipótese seria que a LDL pode não fornecer a mesma proteção contra o estresse osmótico causado pelo congelamento quanto a gema de ovo. A gema de ovo contém proteínas como a lipoproteína de alta densidade (HDL) e outros componentes lipídicos, que ajudam a estabilizar as membranas celulares durante o congelamento e descongelamento. Essas proteínas e lipídios são conhecidos por formar uma espécie de "escudo" ao redor das células, reduzindo a formação de cristais de gelo e a ruptura da membrana. A composição lipídica da LDL não é seria eficaz na estabilização da membrana plasmática dos espermatozoides durante a congelação. A gema de ovo contém lipídios, colesterol e antioxidantes que oferecem uma proteção melhor contra o estresse osmótico e o estresse oxidativos; a propriedade viscoelástica da gema de ovo ajuda a reduzir a formação de cristais de gelo e protege contra a desidratação excessiva e por fim, a LDL não interage tão eficazmente com a membrana dos espermatozoides, reduzindo sua capacidade de proteger as células durante o congelamento e descongelamento. Esses fatores combinados explicam os melhores resultados do meio comercial a base de gema de ovo em relação à LDL para a preservação dos espermatozoides durante o processo de criopreservação.

Observamos em nosso estudo que o diluente BWW contendo LDL não foi eficaz em preservar atributos celulares importantes. Uma hipótese seria que a LDL pode não fornecer a mesma proteção contra o estresse osmótico causado pelo congelamento quanto a gema de ovo. A gema de ovo contém proteínas como a lipoproteína de alta densidade (HDL) e outros componentes lipídicos, que ajudam a estabilizar as membranas celulares durante o congelamento e descongelamento. Essas proteínas e lipídios são conhecidos por formar uma espécie de "escudo" ao redor das células, reduzindo a formação de cristais de gelo e a ruptura da membrana. A composição lipídica da LDL não é seria eficaz na estabilização da membrana plasmática dos espermatozoides durante a congelação. A gema de ovo contém lipídios, colesterol e antioxidantes que oferecem uma proteção melhor contra o estresse osmótico e o estresse oxidativos; a propriedade viscoelástica da gema de ovo ajuda a reduzir a formação de cristais de gelo e protege contra a desidratação excessiva e por fim, a LDL não interage tão eficazmente com a membrana dos espermatozoides, reduzindo sua capacidade de proteger as células durante o congelamento e descongelamento. Esses fatores combinados explicam os melhores resultados do meio comercial a base de gema de ovo em relação à LDL para a preservação dos espermatozoides durante o processo de criopreservação.

Os diluentes BWW com inclusão de rosiglitazona foram pouco competentes em preservar espermatozoides equinos congelados. A rosiglitazona, um agonista do receptor PPAR- γ (SWENGE *et al.*, 2016), pode ter comprometido a efetividade da LDL na criopreservação de espermatozoides por diversos mecanismos, afetando principalmente a integridade da membrana espermática, o metabolismo energético e o equilíbrio oxidativo. A LDL é amplamente utilizada na criopreservação de espermatozoides devido à sua capacidade de estabilizar a membrana plasmática, reduzindo o impacto das baixas temperaturas e do estresse osmótico (ANDRADE *et al.*, 2007). No entanto, a rosiglitazona pode modificar a composição lipídica da membrana celular ao regular a expressão de genes relacionados ao

metabolismo lipídico. Essas alterações podem reduzir a incorporação eficiente da LDL, comprometendo a proteção contra danos estruturais induzidos pelo congelamento (WATSON, 2000). A criopreservação já induz um aumento da produção de EROs, o que pode levar à peroxidação lipídica da membrana espermática e danos ao DNA (AITKEN *et al.*, 2012). A rosiglitazona pode exacerbar esse efeito ao interferir no metabolismo antioxidante e na atividade mitocondrial, promovendo um ambiente pró-oxidativo que compromete ainda mais a viabilidade espermática após o descongelamento (GHARACHLORLOO *et al.*, 2016).

A motilidade espermática depende da funcionalidade mitocondrial, que fornece ATP para os processos celulares necessários à movimentação dos espermatozoides (WATSON, 2000). A rosiglitazona pode afetar a regulação da fosforilação oxidativa ao alterar a expressão de genes mitocondriais mediados por PPAR- γ . Como resultado, ocorre um prejuízo na produção de energia, o que pode reduzir a motilidade espermática pós-descongelamento e, conseqüentemente, a taxa de fertilização (GHARACHLORLOO *et al.*, 2016). A LDL desempenha um papel essencial na proteção da membrana espermática ao fornecer fosfolipídios e colesterol, componentes fundamentais para manter a estabilidade estrutural e funcional durante a criopreservação (ANDRADE *et al.*, 2007). No entanto, a rosiglitazona pode interferir na capacidade da LDL de se incorporar de forma eficaz à membrana, prejudicando sua ação protetora e levando a um aumento da fragmentação do DNA e da apoptose espermática (AITKEN *et al.*, 2012).

Dessa forma, sugerimos que a rosiglitazona nas concentrações testadas, pode afetar negativamente a criopreservação de espermatozoides ao alterar a fluidez da membrana, aumentar o estresse oxidativo, comprometer a bioenergética mitocondrial e modificar a interação da LDL com os espermatozoides. Esses fatores, combinados, podem reduzir significativamente a viabilidade e a funcionalidade espermática pós-descongelamento.

Observamos em nosso estudo que o diluente BWW contendo LDL não foi eficaz em preservar atributos celulares importantes. Uma hipótese seria que a LDL pode não fornecer a mesma proteção contra o estresse osmótico causado pelo congelamento quanto a gema de ovo. A gema de ovo contém proteínas como a lipoproteína de alta densidade (HDL) e outros componentes lipídicos, que ajudam a estabilizar as membranas celulares durante o congelamento e descongelamento. Essas proteínas e lipídios são conhecidos por formar uma espécie de "escudo" ao redor das células, reduzindo a formação de cristais de gelo e a ruptura da membrana. A composição lipídica da LDL não é seria eficaz na estabilização da membrana plasmática dos espermatozoides durante a congelação. A gema de ovo contém lipídios, colesterol e antioxidantes que oferecem uma proteção melhor contra o estresse osmótico e o estresse oxidativos; a propriedade viscoelástica da gema de ovo ajuda a reduzir a formação de cristais de gelo e protege contra a desidratação excessiva e por fim, a LDL não interage tão eficazmente com a membrana dos espermatozoides, reduzindo sua capacidade de proteger as células durante o congelamento e descongelamento. Esses fatores combinados explicam os melhores resultados do meio comercial a base de gema de ovo em relação à LDL para a preservação dos espermatozoides durante o processo de criopreservação.

Os diluentes BWW com inclusão de rosiglitazona foram pouco competentes em preservar espermatozoides equinos congelados. A rosiglitazona, um agonista do receptor PPAR- γ (SWENGE *et al.*, 2016), pode ter comprometido a efetividade da LDL na criopreservação de espermatozoides por diversos mecanismos, afetando principalmente a integridade da membrana espermática, o metabolismo energético e o equilíbrio oxidativo. A LDL é amplamente utilizada na criopreservação de espermatozoides devido à sua capacidade de estabilizar a membrana plasmática, reduzindo o impacto das baixas temperaturas e do estresse osmótico (ANDRADE *et al.*, 2007). No entanto, a rosiglitazona pode modificar a composição lipídica da membrana celular ao regular a expressão de genes relacionados ao

metabolismo lipídico. Essas alterações podem reduzir a incorporação eficiente da LDL, comprometendo a proteção contra danos estruturais induzidos pelo congelamento (WATSON, 2000). A criopreservação já induz um aumento da produção de EROs, o que pode levar à peroxidação lipídica da membrana espermática e danos ao DNA (AITKEN *et al.*, 2012). A rosiglitazona pode exacerbar esse efeito ao interferir no metabolismo antioxidante e na atividade mitocondrial, promovendo um ambiente pró-oxidativo que compromete ainda mais a viabilidade espermática após o descongelamento (GHARAGOZLOO; AITKEN., 2016). A captação de glicose pelas células é mediada principalmente pelo transportador GLUT4, cuja translocação para a membrana plasmática é estimulada pela insulina, a taxa de translocação do GLUT4 estimulada pela insulina é dependente da temperatura. Portanto, a diminuição da temperatura pode retardar a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática, reduzindo temporariamente a eficiência da captação de glicose pelas células (THURMOND *et al.*, 2000)

A motilidade espermática depende da funcionalidade mitocondrial, que fornece ATP para os processos celulares necessários à movimentação dos espermatozoides (WATSON, 2000). A rosiglitazona pode afetar a regulação da fosforilação oxidativa ao alterar a expressão de genes mitocondriais mediados por PPAR- γ . Como resultado, ocorre um prejuízo na produção de energia, o que pode reduzir a motilidade espermática pós-descongelamento e, conseqüentemente, a taxa de fertilização (GHARAGOZLOO; AITKEN, 2016). A LDL desempenha um papel essencial na proteção da membrana espermática ao fornecer fosfolípidios e colesterol, componentes fundamentais para manter a estabilidade estrutural e funcional durante a criopreservação (ANDRADE *et al.*, 2007). No entanto, a rosiglitazona pode interferir na capacidade da LDL de se incorporar de forma eficaz à membrana, prejudicando sua ação protetora e levando a um aumento da fragmentação do DNA e da apoptose espermática (AITKEN *et al.*, 2012).

Dessa forma, sugerimos que a rosiglitazona ativa várias vias moleculares que podem competir com os efeitos da LDL, como a regulação do metabolismo lipídico e a promoção da oxidação de ácidos graxos. Quando administrada em conjunto com a LDL, esses efeitos sinérgicos podem se anular ou até interferir mutuamente, prejudicando a função de crioproteção da LDL. A inclusão de rosiglitazona no processo de criopreservação de espermatozoides pode ter reduzido a efetividade da LDL devido à interação com vários mecanismos celulares. A rosiglitazona pode alterar o metabolismo lipídico, competir por lipídios essenciais, aumentar a produção de radicais livres e modificar a função mitocondrial, todos fatores que podem comprometer os efeitos protetores da LDL nas membranas celulares dos espermatozoides. Essa interação metabólica e os efeitos da congelação podem resultar em uma diminuição da motilidade espermática e de outros parâmetros cinemáticos após a descongelação.

5. CONCLUSÃO

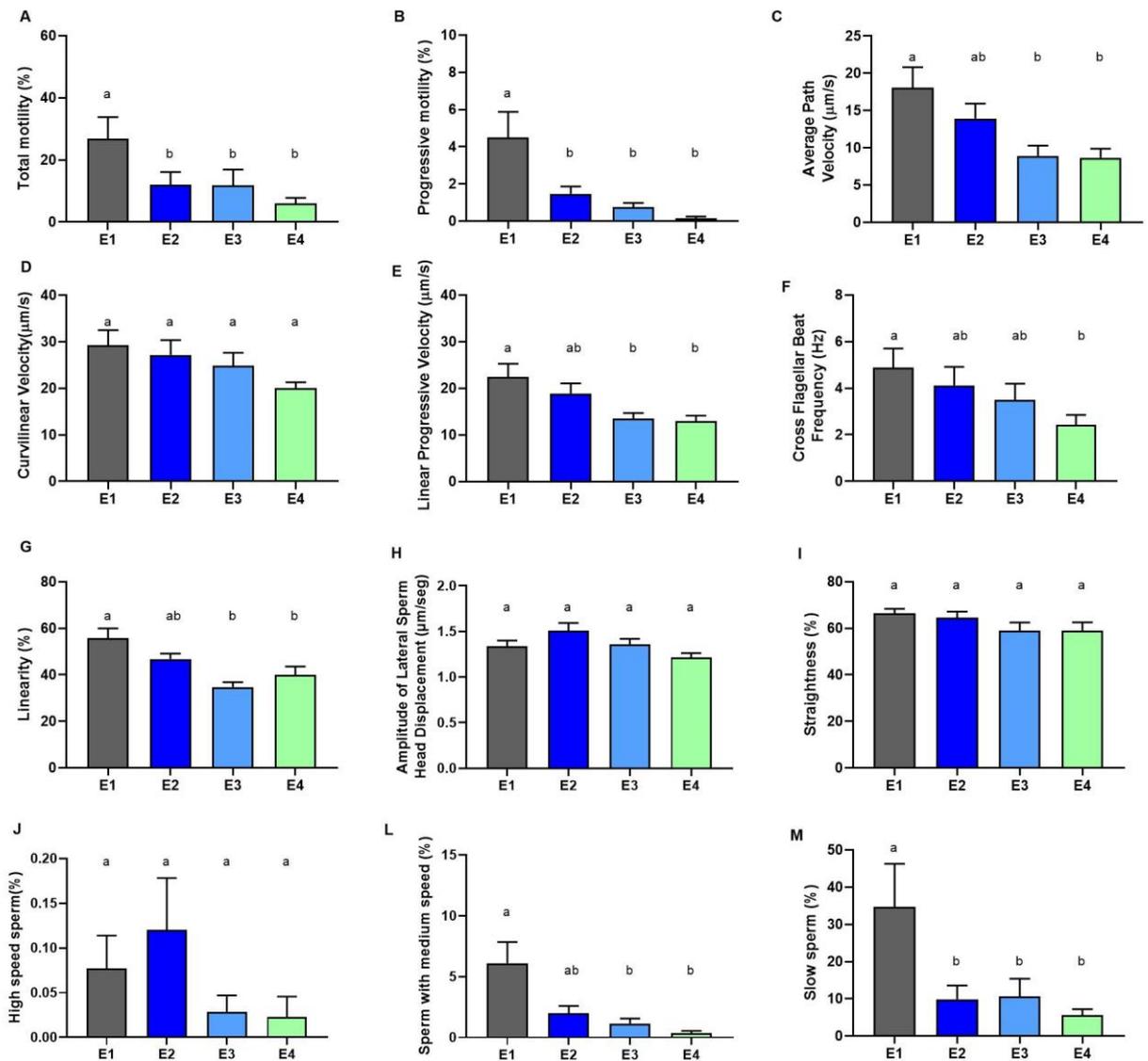
Diante dos resultados apresentados, concluímos que os diluidores com meio BWW e suas associações promoveram manutenção de atributos celulares importantes compactação de DNA e atividade mitocondrial, no entanto mais estudos precisam ser realizados afim de encontrar concentração que melhorem os parâmetros de cinemática e integridade estrutural de membrana plasmática no sêmen pós-congelamento.

6. AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), ao Laboratório de Reprodução Animal (LARA), a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e a Fazenda Primavera.

7. FIGURAS E LEGENDAS DE FIGURAS

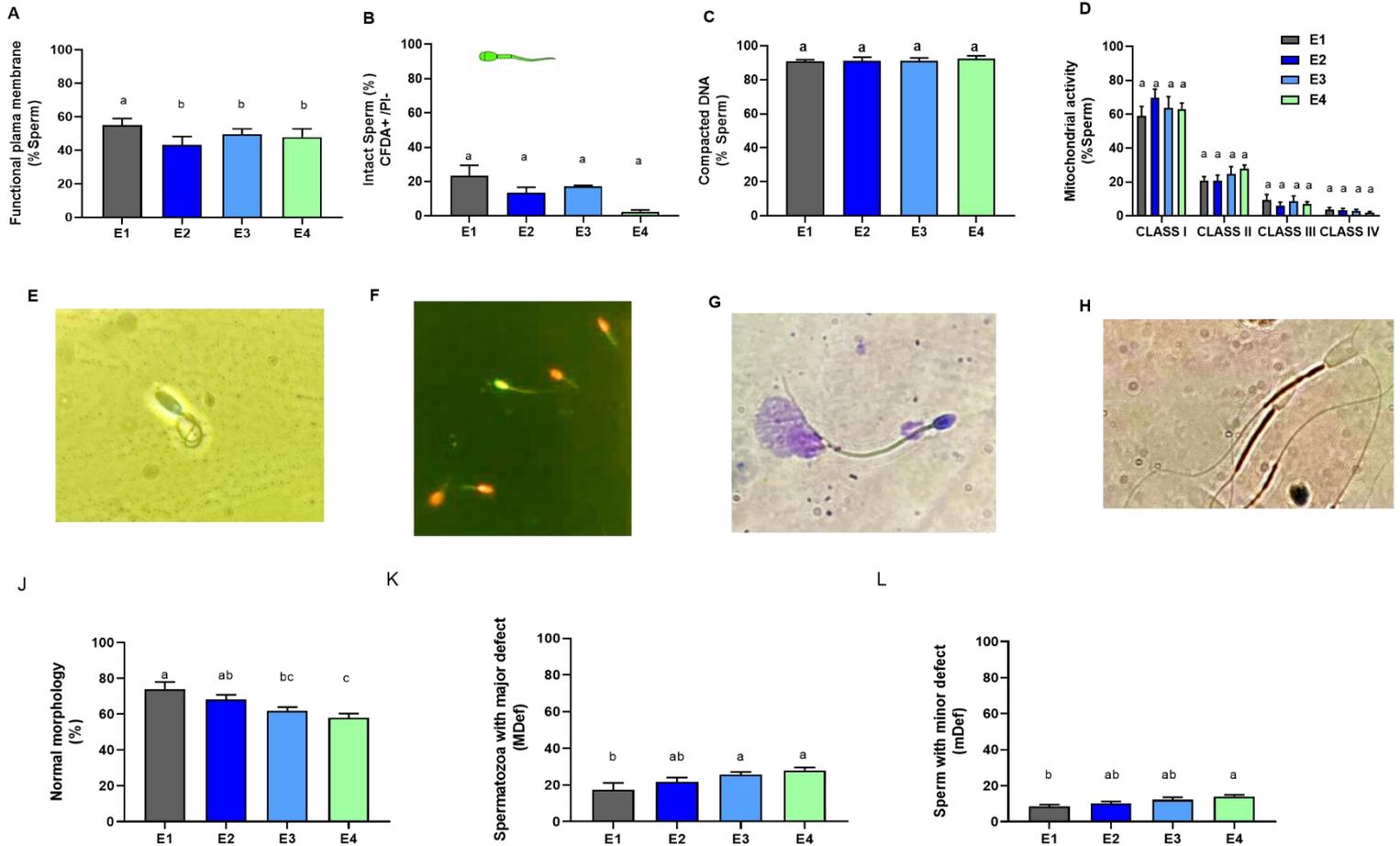
Figura 1 - Parâmetros de movimento espermático avaliados depois da descongelação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, criopreservados em diferentes diluidores.



A) Motilidade total (TM; %); B) Motilidade progressiva (PM; %); C) Velocidade média de percurso (VAP; $\mu\text{m/s}$); D) Velocidade da linha curva (VCL; $\mu\text{m/s}$); E) Velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$); F) Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF; Hz); G)

Linearidade (LIN; %); H) Amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH; $\mu\text{m/s}$); I) Retidão (STR; %); J) Velocidade rápida (RAP; %); L) Velocidade média (MED; %); M) Velocidade lenta (SLOW; %); Legendas: E1 = BotuCrio®; E2 = BWW(I) + 10% de LDL + 2% de glicerol + 3 de dimetilformamida; E3 = BWW(II) + 10% de LDL + 30ng/mL^{-1} de DHA + $50\ \mu\text{M}$ de ROSI + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; E4 = BWW(II) + 30ng/mL^{-1} de DHA + $50\ \mu\text{M}$ de ROSI + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figura 2. Parâmetros de compactação de DNA, integridade de membrana, atividade mitocondrial e morfologia espermática avaliados depois da descongelação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, criopreservados em diferentes diluidores.



A) Espermatozoides funcionalmente íntegros pelo teste hiposmótico (HOST); B) Espermatozoides com membrana estrutural íntegra (CFDA+); C) Espermatozoides com cromatina compacta (DNA+); D) Espermatozoides com atividade mitocondrial classe I (DABI). Espermatozoides com atividade mitocondrial classe II (DABII). Espermatozoides com atividade mitocondrial classe III (DABIII). Espermatozoides com atividade mitocondrial classe IV (DAB IV). E) Fotomicrografia representativa de células de sêmen equino com membrana plasmática funcional, com reatividade ao ambiente hiposmótico ; F) Fotomicrografia representativa de células de sêmen equino evidenciando a qualidade da membrana plasmática;

em destaque, uma célula emitindo luz vermelha indicando dano à membrana plasmática, e outra com luz verde indicando membrana plasmática intacta; G) Fotomicrografia representativa de células de sêmen equino com DNA compactado; H) Fotomicrografia representativa de células de sêmen equino com coloração DAB em mitocôndrias; J) Espermatozoides morfologicamente normais; K) Espermatozoides com defeitos maiores; L) Espermatozoides com defeitos menores. ^{abc} Letras sobrescritas indicam diferenças dentro da linha. reatividade ao ambiente hiposmótico. Legendas: E1 = BotuCrio®; E2 = BWW(I) + 10% de LDL + 2% de glicerol + 3 de dimetilformamida; E3 = BWW(II) + 10% de LDL + 30ng/mL⁻¹ de DHA + 50 µM de ROSI + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; E4 = BWW(II) + 30ng/mL⁻¹ de DHA + 50 µM de ROSI + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

6. ARTIGO II

USO DE ERGOTIONEÍNA E CISTEAMINHA EM MEIO BWW PARA CONGELAÇÃO DE SEMEN EQUINO

Artigo redigido segundo as normas da Andrology US/ Qualis A1/ Fator de impacto: 4,6/
ISSN: 2047-2919.

USO DE ERGOTIONEÍNA E CISTEAMINHA EM MEIO BWW PARA CONGELAÇÃO DE SEMEN EQUINO

USE OF ERGOTHIONEIN AND CYSTEAMINE IN BWW MEDIA FOR FREEZING EQUINE SEMEN

Larissa Rodrigues Santana^{a*}, William Morais Machado^b, Kessia Sheille Santos Mendes^a, Bianca Abreu^a, Luciano Cardoso Santos^a, Milton Albuquerque Franco Oliveira, Ivan Bezerra Allaman^a, Paola Pereira das Neves Snoeck^a

^a *Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rod. Jorge Amado, Km 16 - Salobrinho, Ilhéus, Bahia, 45662-900, Brasil.*

^bFaculdade de Irecê, Irecê – Bahia, Brasil.

* Autor correspondente.

Email: lrsantana@uesc.br

RESUMO

Os antioxidantes são substâncias com capacidade para proteger os espermatozoides de possíveis lesões provocadas pelo estresse oxidativo que ocorrem durante todas as etapas da criopreservação. Dessa forma, objetivou-se avaliar se o meio BWW, com a incorporação de glicerol e dimetilformamida, enriquecido com lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ergotioneína ou cisteamina, é capaz de manter os parâmetros de movimento espermático, integridade estrutural dos espermatozoides, morfologia celular, a integridade funcional, a atividade mitocondrial diaminobenzidina e a compactação do DNA avaliada pelo azul de toluidina como um diluidor comercial contendo gema de ovo. Para a realização deste estudo foram coletados com vagina artificial oito ejaculados provenientes de diferentes garanhões. O sobrenadante foi desprezado e o pellet diluído nos respectivos diluidores: D1) Meio comercial com gema de ovo (BotuCrio[®]); D2) BWW+10% de LDL+2% de glicerol+3% de dimetilformamida (BWW-I); D3) BWW-I+5mM de ergotioneína +; D4) BWW-I+5mM de cisteamina; para obter uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL. Os diluidores quimicamente definido do tipo BWW preservaram a morfologia dos espermatozoides, a atividade mitocondrial alta, intermediária, baixa e a compactação do DNA igualmente ao meio com gema de ovo ($P > 0,05$). No entanto, o diluidor comercial foi superior aos meios BWW com ou sem antioxidante em preservar a funcionalidade da membrana plasmática ($P < 0,05$). Os diluidores quimicamente definido do tipo BWW (D2; D3 e D4) não foram eficientes como o meio contendo gema de ovo para preservar os parâmetros de movimento espermático (motilidade total e progressiva; percentual de médio e lentos; velocidade média do trajeto e linear progressiva; retilinearidade; linearidade e batimento flagelar cruzado; $P < 0,05$). O percentual de espermatozoides com movimento rápido foi insignificante, entre 0 e 0,48%, em todas as amostras congeladas em meio gema e BWW (D1; D2; D3 e D4; $P > 0,05$). As médias da velocidade curvilínea foram maiores nas amostras congeladas em meio com gema e BWWcrio sem antioxidantes (D1 e D2; $P < 0,05$). A média da amplitude do deslocamento lateral da cabeça foi menor nas amostras congeladas em meio contendo cisteamina (D4; $P < 0,05$). Todos os diluidores testados foram semelhantes em preservar a integridade estrutural das membranas ($P > 0,05$). Concluímos que o diluidor quimicamente definido BWWcrio, com ou

sem antioxidantes, não preserva de forma eficiente parâmetros de movimento espermático, além de preservar a integridade funcional dos espermatozoides, comprometendo uma característica de viabilidade importante para a fecundação, importantes para garantir o deslocamento da célula até o local de fecundação.

Palavras-chaves: Amoniácidos. Antioxidantes. Congelação. Enzimas. Garanhão.

1.INTRODUÇÃO

O uso de diluidores de sêmen durante a congelação é essencial para preservar a viabilidade e a funcionalidade dos espermatozoides. Os diluidores atuam protegendo os espermatozoides contra esses danos celulares e garante melhores taxas de sobrevivência pós-descongelação (WATSON, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2002). A grande maioria dos diluidores de congelação de sêmen possuem na sua formulação gema de ovo e seus derivados ou uma combinação gema de ovo e leite para proteger os espermatozoides do choque térmico durante o processo de refrigeração que ocorre antes da congelação (MARTINS *et al.*, 2007). Entretanto, a formulação de diluidores com constituintes de origem animal oferece maiores riscos sanitários, (PAPA; FELICIO, 2011) além de não apresentarem uma composição quimicamente definida (PLANTE *et al.*, 2015).

Nesse sentido, a confecção de diluentes quimicamente definidos oferece maior segurança biológica e apresenta um meio com composição padronizada. Um meio quimicamente definido, descrito por Biggers, Whitten, e Whittingham (BWW) modificado por Gibb *et al.* (2015), suplementado com L-carnitina e Piruvato de Sódio promoveu manutenção dos valores cinemáticos por 72 horas em em sêmen equino, utilizado em temperatura ambiente. Ao ser utilizado em sêmen refrigerado, o meio BWW suplementado com lecitina de soja promoveu a manutenção da viabilidade do sêmen equino a 15°C por até 24 horas (MACHADO *et al.*, 2023). O meio BWW +10% de LDL também conseguiu preservar de maneira eficiente os parâmetros integridade funcional e percentual de espermatozoides estruturalmente íntegros para refrigerar sêmen equino a 15 °C (BRITO, 2022).

Durante a congelação do sêmen, os espermatozoides estão sujeitos a danos oxidativos devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses danos podem comprometer a viabilidade e a funcionalidade espermática, afetando a fertilidade pós-descongelação (AGARWAL; MAJZOUB, 2017). A membrana plasmática dos espermatozoides equino contém uma alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, tornando-os extremamente vulneráveis à peroxidação lipídica causada pelas espécies reativas

de oxigênio (EROs). Esse processo leva a perda da fluidez da membrana, prejudicando a fusão espermatozoide-oócito. (AITKEN; CURRY, 2011). As EROs podem causar quebras na cadeia do DNA espermático, resultando em aumento da fragmentação do DNA e redução da viabilidade (AGARWAL; MAJZOUN, 2017). Além disso, a oxidação causada pela congelamento pode modificar proteínas essenciais para a motilidade espermática e a integridade estrutural, levando a redução da produção de ATP e comprometendo a motilidade (GUTHRIE; WELCH, 2012). O estresse oxidativo pode ativar vias de sinalização celular que induzem uma capacitação prematura dos espermatozoides ou mesmo a apoptose, diminuindo sua longevidade e fertilidade (AITKEN; CURRY, 2011).

Os antioxidantes são utilizados para proteger os espermatozoides de possíveis lesões provocadas pelo estresse oxidativo que ocorrem durante todas as etapas da criopreservação (SICHERLE *et al.*, 2020). A ergotoneína é um antioxidante natural, que vem demonstrando resultados promissores em diversas espécies, equinos (LOBO *et al.*, 2024), caninos (USUGA *et al.*, 2021) e ovinos (COYAN *et al.*, 2011) devido a sua grande capacidade antioxidante (SOTGIA *et al.*, 2020). Sua atuação funciona através da eliminação de radical hidroxila (OH) e inibição da geração dependente de íons de ferro ou cobre de \bullet OH a partir do peróxido de hidrogênio (AKANMU *et al.*, 1991). A cisteamina (C_2H_7NS) é um composto organossulfurado, derivado da degradação da cisteína (PISONI *et al.*, 1995), atua como precursor na síntese de glutathione, um antioxidante intracelular crucial para a proteção celular contra danos oxidativos, ao aumentar os níveis de glutathione, contribui para a neutralização de EROs, protegendo os espermatozoides contra danos oxidativos que podem afetar sua viabilidade e função (CROCOMO *et al.*, 2012).

Devido ao seu potencial antioxidante, a cisteamina tem sido estudada em espermatozoides durante o processo de criopreservação. No entanto, pesquisas indicam que a inclusão de cisteamina em diluidores de sêmen pode não ser benéfica e, em alguns casos, pode até reduzir a qualidade espermática. Santana *et al.* (2024) avaliaram a adição de ergotoneína e cisteamina em diluidores de criopreservação de sêmen equino e observou uma redução expressiva nos parâmetros de qualidade espermática. Seu uso em espermatozoides ovinos congelados e observado que essa associação pode trazer impactos negativos para o espermatozoide (COYAN *et al.*, 2011). No sêmen congelado de galos, a cisteamina reduziu a peroxidação lipídica, porém reduziu também a viabilidade celular, mesmo em doses baixas comprometendo a fertilidade do espermatozoide (THANANURAK *et al.*, 2020).

Assim sendo, nosso objetivo foi avaliar se a inclusão de 5mM dos antioxidantes ergotoneína ou cisteamina em meio BWW contendo LDL preserva os parâmetros de

viabilidade para garantir potencial fecundante dos espermatozoides equino, como os meios contendo gema de ovo

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 LOCAL E ANIMAIS EXPERIMENTAIS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal CEUA/UESC da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil com o número de protocolo 004/16.

Foram utilizados oito ejaculados de oito garanhões Mangalarga Marchador, considerados aptos à reprodução e com volume entre 40 e 60 ml, cor branca acinzentada, odor *sui generis*, motilidade espermática $\geq 60\%$, vigor ≥ 3 , espermatozoide morfologicamente normais $\geq 70\%$, parâmetros seminais característicos segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (2013). A coleta e congelamento de sêmen foram conduzidas em um haras localizado no município de Itabuna, Latitude: -14.7892, Longitude: -39.2778, 14° 47' 21" Sul, 39° 16' 40" Oeste, região Sul do Estado da Bahia – Brasil, durante os meses de julho e agosto. Todas as amostras foram descongeladas e analisadas no Laboratório de Reprodução Animal (LARA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC). Todos os garanhões foram submetidos ao exame andrológico prévio e posteriormente ao esgotamento das suas reservas espermáticas extragonadais por meio de coletas de sêmen seriadas por pelo menos sete dias com vagina artificial modelo Botupharma® (Botucatu, SP, Brasil) e auxílio de uma fêmea em estro como manequim, seguido de um período de descanso de 48 horas.

2.2 COLETA DO SÊMEN E AVALIAÇÃO

Foi realizado exame andrológico prévio a congelamento e selecionado os ejaculados com no mínimo 70% de motilidade, vigor 3, 70% de espermatozoides morfologicamente normais e 65% funcionalmente íntegros. A coleta de sêmen foi realizada utilizando vagina artificial apropriada, modelo Botupharma®, preenchida previamente com água aquecida para garantir uma temperatura interna em torno de 42 °C, usando éguas em estro induzido com Cipionato de estradiol (E.C.P.®; 4mg/kg/ via intramuscular), como manequim. Após a coleta, a fração gel dos ejaculados foi filtrada e o sêmen avaliado de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas: volume, cor, odor, aspecto, motilidade total (MT) motilidade progressiva (MP) e vigor espermático, segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (2013). Com posterior diluição de uma alíquota do sêmen em citrato de sódio formolizado a

4% (1:20), para determinação da concentração espermática em câmara de Neubauer e da morfologia espermática pela técnica de preparação úmida, com avaliação de 200 espermatozoides.

2.3 CONGELAÇÃO DE SÊMEN E CONFECÇÃO DE DILUIDORES

2.3.1 EXTRAÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS DE BAIXA DENSIDADE (LDL)

Para a extração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) utilizou-se o protocolo descrito por Moussa et al. (2002), com adaptações. O relatório da extração utilizado está descrito no apêndice.

2.3.2 CONFECÇÃO DE DILUIDORES

Os ejaculados coletados foram diluídos na proporção de 1:2 (v/v) em diluidor a base de leite (GIBB et al., 2015) e centrifugados a 12000x G por 10 min. O pellet foi diluído para testar: D1) Meio a base de gema de ovo (BotuCrio®); D2) BWW+10% de LDL+2% de glicerol+3% de dimetilformamida (BWW-I); D3) BWW-I+5mM de ergotioneína +; D4) BWW-I+5mM de cisteamina;

A composição de diluidor BWW-I, quimicamente definido (BIGGERS *et al.*, 1971), modificado por (GIBB *et al.*, 2015), composto por 5,54g NaCl, 356 mg KCl, 1,7 mM CaCl₂. 2H₂O, 1,2 mM KH₂ PO₄, 1,2 mM MgSO₄ • 7H₂O, 25 mM NaHCO₃, 5,6 mM de D-glicose, 275 µM de piruvato de sódio, 3,7 µl/ml de lactato de sódio 60%, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina, 250 µg/mL de gentamicina, 20 mM de HEPES e 0,1% (w/v) álcool polivinílico, com osmolalidade e pH de aproximadamente 300 mOsm/kg e 7,2, respectivamente, foi utilizado como meio base.

2.3.3 CONGELAÇÃO DE SÊMEN

O sêmen diluído foi envasado em palhetas de 0,5 mL e submetidas a criopreservação em sistema automatizado Neovet Cryogen HSE® portátil (Uberaba, Brasil), utilizando a seguinte curva: - 1,00 °C/min de 20,5 °C até 5 °C, seguido de 1 min de equilíbrio na temperatura de 5 °C; em seguida, congelação com taxa de -30,00 °C/min na rampa 1 e -30,00 °C/min na rampa 2 até atingir -100°C, com posterior imersão das palhetas em nitrogênio líquido (-196 °C) para finalizar o processo de congelação. A descongelação foi realizada com imersão das

palhetas em banho-maria a 46 °C por 20 seg com posterior imersão em banho-seco a 37 °C por 30 seg.

2.4 ANÁLISES ESPERMÁTICAS

2.4.1 CINEMÁTICA

O movimento espermático das amostras descongeladas foi avaliado por um sistema computadorizado Sperm Class Analyser® - CASA (SCA evolution, Microoptics S.L, Barcelona, Espanha). Os padrões utilizados para o ajuste do equipamento foram: 25 imagens/seg com 25 Hertz (Hz); tamanho de partícula capturado entre 4 e 75 μm^2 ; espermatozoides considerados imóveis <10 $\mu\text{m/s}$, lentos <45 $\mu\text{m/s}$, médios de 45 a 90 $\mu\text{m/s}$ e rápidos >90 $\mu\text{m/s}$. Foram avaliados os seguintes parâmetros: motilidade total (MT;%), motilidade progressiva (MP; %), linearidade (LIN; %), retilinearidade (STR; %), velocidade curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$), velocidade média do trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH; μm), e frequência do batimento flagelar cruzado (BCF; Hz).

2.4.2 INTEGRIDADE FUNCIONAL DE MEMBRANA PLASMÁTICA

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada pela determinação do percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST) depois da diluição de 50 μL da amostra em 500 μL de solução de sacarose a 100 mOsmol/L. As amostras foram incubadas em banho seco a 37°C durante 30 min e posteriormente fixadas com 250 μL de solução de citrato de sódio formolizado a 4%, seguida de avaliação de 200 células em microscópio de contraste de fase (1000x; Olympus® CX 31). A porcentagem de células funcionalmente íntegras foi calculada da seguinte forma: $\text{HOST\%} = \% \text{ de alterações na região da cauda após o HOST} - \% \text{ de alterações na região da cauda antes do HOST}$, de acordo com o método de Melo e Henry (1999). As alterações de cauda antes e depois da incubação, em solução hiposmótica, foram analisadas por meio da técnica de preparação úmida.

2.4.3 INTEGRIDADE ESTRUTURAL DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL

A integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal das amostras de sêmen descongeladas foi avaliada em microscópio fluorescente (400X; Olympus® CX 31) usando os fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) de acordo com o método de Harrison e Vickers (1990). A coloração com CFDA foi avaliada usando o conjunto

padrão de filtro de fluoresceína, enquanto a coloração com IP foi avaliada usando o conjunto padrão de filtros de rodamina. Foram analisados 200 espermatozoides por amostra. Os espermatozoides foram classificados como viáveis aqueles estruturalmente íntegros, com membrana plasmática e acrossomal intactas (CFDA+/ IP-).

2.4.4 INTEGRIDADE DA CROMATINA

A integridade da cromatina espermática em amostras de sêmen descongelada foi avaliada pela técnica da metacromasia induzida pelo azul de toluidina (NAVES *et al.*, 2004). Foram confeccionados esfregaços com uma alíquota de 10 µL da amostra, secados em temperatura ambiente e fixados por 1 min em solução de Carnoy (3:1, 75 mL de álcool 100 % + 25 mL de ácido acético) e em seguida em álcool a 70 % por 3 min. Procedeu-se á hidrólise com ácido clorídrico 4N por 15 minutos, lavagem em água destilada e secagem em temperatura ambiente. Para a coloração do esfregaço foram depositados 20 µL da solução de azul de toluidina a 0,025 % (0,00125 g de azul de toluidina em 5 mL de solução de McIlveine, pH 4,0) entre lâmina e lamínula e avaliados 200 espermatozoides em microscopia de contraste de fase no aumento de 1000x (Olympus® CX 31). Os espermatozoides foram classificados com cromatina compacta (região da cabeça corada em azul claro) e com cromatina descompactada (região da cabeça corada em azul escuro ou violeta). Foram considerados viáveis aqueles espermatozoides com cromatina compacta.

2.4.5 ATIVIDADE MITOCONDRIAL

A atividade mitocondrial foi avaliada depois da descongelação do sêmen, por meio da coloração de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) segundo a técnica de Hrudka (1987), sendo que 20 µL da amostra será incubada com 20 µL de DAB (1mg/mL de PBS) a 37 °C por 60 minutos, na ausência de luz. Após a incubação foram confeccionados esfregaços, fixados em formol a 10 % por 10 minutos, lavados em água destilada e secados ao ar sob proteção da luz. Foram avaliados 200 espermatozoides em microscópio de contraste de fase (1000x; Olympus® CX 31) e classificadas de acordo com o nível de deposição do corante na peça intermediária (PI). Na classe I, os espermatozoides que apresentarem a peça intermediária totalmente corada (alta atividade mitocondrial); na classe II, mais de 50 % da peça intermediária corada (atividade mitocondrial intermediária); na classe III, menos de 50 % da peça intermediária corada (baixa atividade mitocondrial) e na classe IV, não apresentarem coloração (atividade mitocondrial inexistente).

2.4.6 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

A morfologia espermática foi avaliada em amostras de sêmen descongeladas pela técnica de preparação úmida. Para a avaliação uma alíquota de 10µl de sêmen foi adicionada a 490 µl de PBS formolizado a 4% tamponado previamente aquecido a 37°C. Foram analisadas 200 células em um microscópio de contraste de fase ou óptico, com objetiva de 100x (com ocular de 10x resulta em aumento de 1000x), sob óleo de imersão (1000x; Olympus® CX 31). As anormalidades morfológicas foram classificadas de acordo com a região da célula onde a mesma ocorreu como: cabeça, peça intermediária ou cauda e também em células normais, defeito maior e defeito menor, de acordo com o Manual de Exame Andrológico (CBRA, 2013).

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

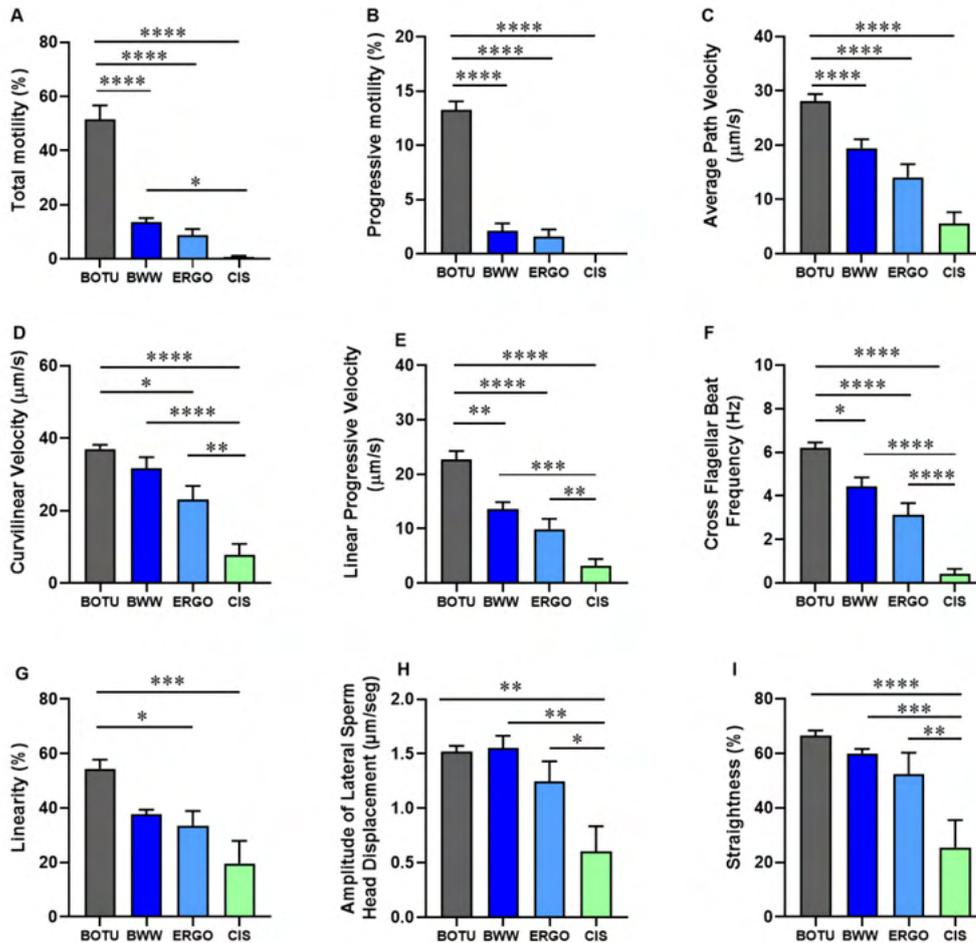
O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, considerado o ejaculado como bloco. Para a comparação do efeito dos diluidores foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida de comparações múltiplas de médias foi utilizado a função Tukey C versão 1.3-4 (FARIA; JELIHOVSCHI; ALLAMAN,2021). Os testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov foram realizados para verificar a normalidade e homocedasticidade dos resíduos. Variáveis que não atenderam os pressupostos passaram por transformação boxcox. Os parâmetros de motilidade, espermatozoides rápidos e lentos precisaram ser comparados pelo teste não paramétrico de Friedman. Todas as análises foram feitas pelo programa Tinn-R versão 8.1.3.4 e os gráficos usando o programa GraphPad prism versão 9.5.0 (730). As hipóteses testadas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

Os espermatozoides criopreservados em meio BWW, com ou sem antioxidantes, foram menos competentes em preservar motilidade (MT e MP), percentual de espermatozoides com velocidade média, lentos, VSL, VAP, LIN, STR e BCF quando comparados aos congelados em meio com gema de ovo ($P < 0,05$; Figura 1). O meio BWW com antioxidantes impactou a VCL quando comparada ao meio com gema de ovo ($P < 0,05$; Figura 1-D). Os espermatozoides congelados em meio BWW com cisteamina estavam com a ALH menor do que os espermatozoides criopreservados em meio contendo gema e o BWW sem ou com ergotioneína ($P < 0,05$; Figura 1-H). Os diluidores com gema de ovo ou quimicamente definido BWW sem ou com os antioxidantes testados foram igualmente competentes em preservar o percentual de

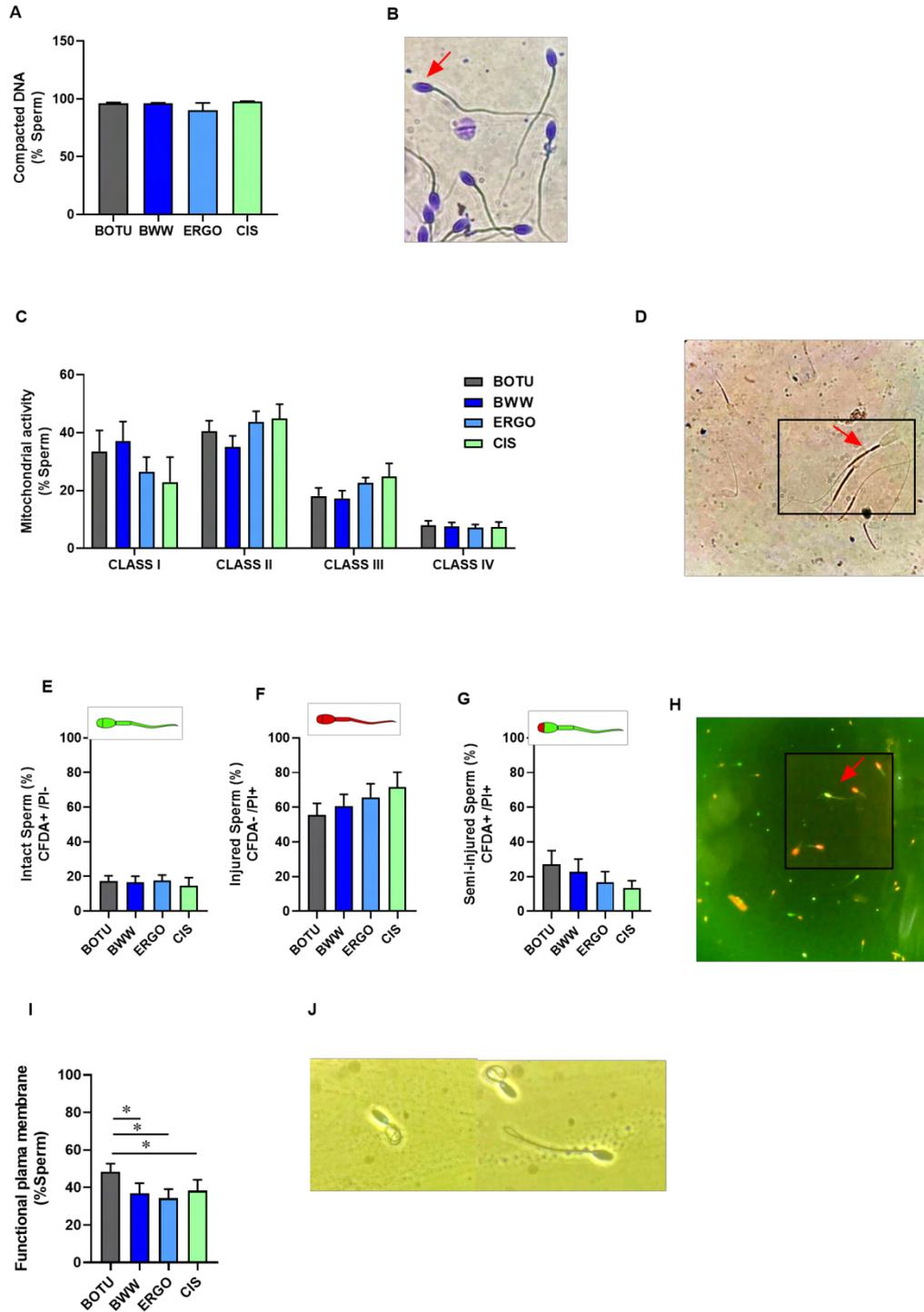
espermatozoides estruturalmente íntegros, a atividade mitocondrial, DNA compactado ($P > 0,05$; Figura 2) e o percentual de morfologicamente normais ($P > 0,05$; Figura 3).

Figura 1 - Parâmetros de movimento espermático avaliados depois da descongelação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, criopreservados em diferentes diluidores.



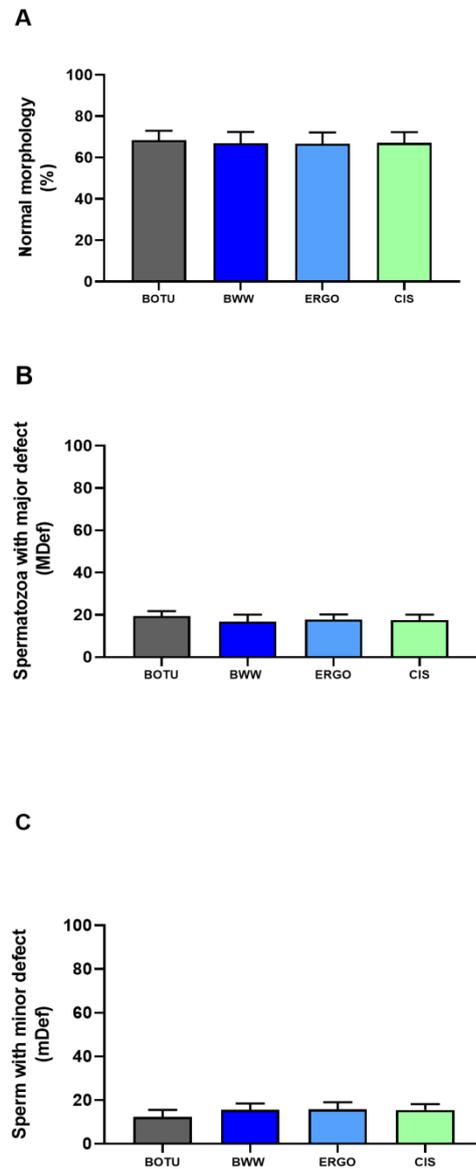
Parâmetros avaliados pelo SCA[®] depois da descongelação: A) Motilidade total (TM; %); B) Motilidade progressiva (PM; %); C) Velocidade média de percurso (VAP; $\mu\text{m/s}$); D) Velocidade da linha curva (VCL; $\mu\text{m/s}$); E) Velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$); F) Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF; Hz); G) Linearidade (LIN; %); H) Amplitude do deslocamento lateral da cabeça do espermatozoide (ALH; $\mu\text{m/s}$); I) Retidão (STR; %);.Legendas: Legendas: BOTU =) BotuCrio[®]; diluidor 2) BWW + 10% de LDL +2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; diluidor 3) BWW + 10% de LDL + 5mM de Ergotioneína + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; diluidor 4) BWW + 10% de LDL + 5mM de Cisteamina + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.; **** $p < 0,0001$.

Figura 2. Parâmetros de compactação de DNA, integridade de membrana e atividade mitocondrial espermática avaliados depois da descongelação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, criopreservados em diferentes diluidores.



A-) Porcentagem de espermatozoides com DNA compactado; B) Fotomicrografia representativa de células de sêmen equino com DNA compactado; C) Porcentagem de espermatozoides distribuídos em quatro classes após avaliação da atividade mitocondrial; D) Fotomicrografia representativa de células de sêmen equino com coloração DAB em mitocôndrias; E-G) Porcentagem de células de sêmen equino com membrana plasmática intacta (E), lesada (F) e semi-lesada (G); H) Fotomicrografia representativa de células de sêmen equino evidenciando a qualidade da membrana plasmática; em destaque, uma célula emitindo luz vermelha indicando dano à membrana plasmática, e outra com luz verde indicando membrana plasmática intacta; I) Porcentagem de células de sêmen equino com membrana plasmática funcional; J) Fotomicrografia representativa de células de sêmen equino com membrana plasmática funcional, com reatividade ao ambiente hiposmótico. Legendas: BOTU =) BotuCrio®; diluidor 2) BWW + 10% de LDL + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; diluidor 3) BWW + 10% de LDL + 5mM de Ergotioneína + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; diluidor 4) BWW + 10% de LDL + 5mM de Cisteamina + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.; **** $p < 0,0001$.

Figura 3 - Parâmetros de morfologia espermática avaliados depois da descongelação de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, criopreservados em diferentes diluidores.



A) Porcentagem de espermatozoides com características normais; B) Porcentagem de espermatozoides com defeito maior; C) Porcentagem de espermatozoides com defeito menor. Legendas: BOTU =) BotuCrio®; diluidor 2) BWW + 10% de LDL + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; diluidor 3) BWW + 10% de LDL + 5mM de Ergotioneína + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida; diluidor 4) BWW + 10% de LDL + 5mM de Cisteamina + 2% de glicerol + 3% de dimetilformamida.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo nós avaliamos o efeito antioxidante da ERGO e CIS em redução os efeitos negativos produzidos pelo efeito da criopreservação. A adição de ERGO e CIS ao diluidor quimicamente definido de congelação reduziu significativamente os parâmetros cinemáticos, afetando negativamente MT, MP, VAP, VSL, VCL, BCF, ALH, LIN E STR.

A membrana plasmática dos espermatozoides é altamente rica em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), tornando-os extremamente suscetíveis à peroxidação lipídica induzida por espécies reativas de oxigênio (EROs). A gema de ovo possui em sua composição fosfolipídios e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que se incorporam à membrana espermática, que aumentam a fluidez mitocondrial, melhorando a eficiência da cadeia transportadora de elétrons e reduzindo a produção de EROs. A presença de colesterol e fosfolipídios estabiliza a membrana mitocondrial, reduzindo o vazamento de elétrons e minimizando a produção excessiva de EROs. Além disso, os lipídios da gema podem servir como fontes alternativas de energia, permitindo melhor manutenção da motilidade e preservação dos parâmetros cinéticos como VAP, BCF e STR. (Amaral et al. (2013; Ferramosca; Zara, 2014). A motilidade espermática é impulsionada por motores moleculares, principalmente a dineína axonêmica, que interage com os microtúbulos do flagelo. Os antioxidantes lipossolúveis da gema protegem as proteínas da dineína da modificação oxidativa, permitindo maior preservação da cinética espermática (De Lamirande; Gagnon, 1992).

O meio BWW, mesmo com antioxidantes adicionados, pode não fornecer a mesma proteção estrutural e bioquímica contra espécies reativas de oxigênio (EROs), impactando negativamente a motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), e outros parâmetros cinéticos (VSL, VAP, BCF, STR, LIN). É um meio dependente de glicose e piruvato como fontes energéticas (GIBB *et al.*, 2016), mas sem suporte lipídico, os espermatozoides podem sofrer menor eficiência mitocondrial e maior produção de radicais livres, levando à diminuição da motilidade progressiva (MP), velocidade linear (VSL), velocidade média (VAP) e outros parâmetros cinéticos (AMARAL *et al.*, 2013). Mesmo com antioxidantes, o BWW pode não oferecer a mesma proteção que os compostos naturais presentes na gema de ovo, pois a sinergia entre os antioxidantes da gema (como a vitamina E e carotenoides) pode ser mais eficaz na neutralização das EROs, além disso sua ação é limitada pois não protege diretamente a estrutura da membrana plasmática, tornando o espermatozoide mais vulnerável a danos oxidativos (PARTYKA *et al.*, 2012)

Apesar da presença de LDL ao meio BWW, a ausência de gema de ovo, pode provocar peroxidação lipídica e o estresse oxidativos, devido a levam à oxidação de resíduos de cisteína e tirosina nas proteínas da dineína, inativando a motilidade flagelar. A fragmentação do citoesqueleto flagelar reduz a frequência do batimento flagelar (BCF) e altera a linearidade do movimento (LIN e STR). O que explicaria a redução dos parâmetros de movimento espermáticos. Apesar de nossos resultados não demonstrarem resultados sugestivos de danos mitocondriais, o teste de avaliação utilizado pode não ter sido suficiente para causar um desafio ao espermatozoide, uma que a axposição a EROs leva à peroxidação lipídica, dano mitocondrial, inativação da dineína e fragmentação do DNA, resultando em menor motilidade e viabilidade.

Embora a ergotioneína seja amplamente reconhecida como um antioxidante protetor, em determinadas condições, altas concentrações ou interações específicas no meio diluidor podem ter levado a efeitos indesejáveis, incluindo morte celular nos espermatozoides durante a criopreservação, como foi observado em nosso estudo. Algumas hipóteses poderiam explicar esse fenômeno, o excesso de ergotioneína, pode se tornar pró-oxidante, promovendo a formação de EROs em vez de neutralizá-las. Isso pode ocorrer por reação com íons metálicos livres no meio diluidor, resultando na geração de radicais livres prejudiciais (BARBOSA *et al.*, 2010).

Os espermatozoides precisam de um nível controlado de EROs para funções fisiológicas normais, como capacitação e reação acrossômica. O excesso de antioxidantes, pode causar alterações do equilíbrio redox intracelular e eliminar radicais essenciais, prejudicando a sinalização celular, levando à disfunção e morte celular (RIBEIRO *et al.*, 2005). Dependendo da composição do meio BWW, a ergotioneína pode interagir com outros antioxidantes ou substâncias (como cisteamina ou glutatona), criando um ambiente reduzido demais ou promovendo a formação de radicais instáveis. A ergotioneína pode afetar a homeostase mitocondrial ao reduzir excessivamente as EROs, que são fundamentais para a produção de ATP na mitocôndria dos espermatozoides. Uma diminuição excessiva nas EROs pode causar colapso do potencial de membrana mitocondrial, resultando em falta de energia e apoptose (SILVA; FERRARI, 2011; AGRIMANNI *et al.*, 2015).

A redução de parâmetros de movimentos espermáticos encontrado em nosso estudo, estão de acordo com outros estudos que encontraram redução dos parâmetros cinemáticos como a VCL e a ALH, mas não comprometeram a funcionalidade de membrana e a capacidade de fertilização *in vitro* do sêmen equino congelado-descongelado (LOBO *et al.*, 2024). Foi observado que doses de ergotioneína superiores a 0,5 mmol tiveram efeitos negativos significativos na pontuação de vigor espermático e na integridade da membrana, para o sêmen

fresco de galo e no sêmen congelado, as doses maiores que 0,06 mmol diminuiram os valores de vigor e a dose maior que 0,08 diminuiu a integridade da membrana. (THANANURAK *et al.*, 2020). Em contrapartida, na espécie canina o sêmen canino congelado, a ergotioneína na concentração de 100 µM causou redução das EROs, redução das alterações deletérias e estresse oxidativo ao espermatozoide (USUGA *et al.*, 2021). No sêmen ovino congelado, a ergotioneína em doses de 2 e 4 mM aumentou as porcentagens de motilidade subjetiva, VSL e VCL. Foi observado que a inclusão de ergotioneína ao diluente promoveu melhores resultados para os parâmetros cinéticos, mas não apresentou diferença nos parâmetros de integridade de membrana e atividade mitocondrial (COYAN *et al.*, 2011).

A ergotioneína não é intrinsecamente tóxica, mas seu efeito depende da concentração e do meio em que é utilizada. Para evitar a morte celular em espermatozoides, é necessário determinar a dose ideal e o equilíbrio correto de antioxidantes no meio diluidor. No sêmen equino congelado mais pesquisas são necessárias afim de encontrar doses mais adequadas para promover preservação durante a criopreservação.

Sabe-se que a cisteamina atua como precursora na síntese de glutathiona, um antioxidante intracelular crucial para a proteção celular contra danos oxidativos, potencializando os níveis de glutathiona, neutralizando as EROs, protegendo os espermatozoides contra danos oxidativos que podem afetar sua viabilidade e função (CROCOMO *et al.*, 2012). No entanto, em nosso estudo, a inclusão de cisteamina ao meio BWW promoveu baixa competência nos espermatozoides criopreservados, nos parâmetros de movimento e funcionalidade espermáticas. Espera-se que em um meio apropriado cisteamina atua como um agente redutor e pode estimular a produção de glutathiona em células, promovendo a proteção antioxidante e a estabilidade celular (CHEREST *et al.*, 2020), contudo, no meio BWW, que já contém albumina e tampões específicos, a cisteamina pode gerar um ambiente redutor excessivo, levando ao estresse oxidativo e ao dano ao DNA espermático. Além disso, a cisteamina, na ausência de um sistema adequado de neutralização de ROS, pode desestabilizar membranas espermáticas e reduzir a motilidade e viabilidade dos espermatozoides.

Nossos resultados estão de acordo com dados encontrados na literatura, onde é relatado que a inclusão de cisteamina em diluidores de sêmen pode não ser benéfica e, em alguns casos, pode até reduzir a qualidade espermática (SANTANA *et al.*, 2024). Algumas espécies apresentaram resultados insatisfatórios com a inclusão da cisteamina em diluentes para congelamento. Em sêmen ovino foi observado que essa associação pode trazer impactos negativos para o espermatozoide (COYAN *et al.*, 2011). No sêmen congelado de galos, mesmo em doses baixas, a cisteamina reduziu a peroxidação lipídica, porém reduziu também a viabilidade

celular, comprometendo a fertilidade do espermatozoide (THANANURAK *et al.*, 2020). Em equinos a adição de cisteamina em diluidores de criopreservação de sêmen equino provocou redução expressiva nos parâmetros de qualidade espermática (SANTANA *et al.*; 2024).

A adição de antioxidantes, como a cisteamina, pode melhorar os resultados da criopreservação de sêmen, mas a eficácia depende de fatores como a concentração do antioxidante, o meio de diluição utilizado e as condições de congelamento e descongelamento. A cisteamina pode interagir com componentes do meio BWW de maneira que sua capacidade antioxidante seja reduzida ou que ocorram efeitos adversos não observados em outros meios.

Dessa forma, a busca por mais estudos específicos faz-se necessária para avaliar a interação entre a cisteamina e o meio BWW, determinando as condições ideais para a preservação de espermatozoides.

5. CONCLUSÕES

Concluimos que os diluidores com meio BWW com associações dos antioxidantes ergotioneína e cisteamina nas concentrações de 5mM e 5mM, respectivamente, preservaram a compactação de DNA e atividade mitocondrial, apesar de terem sido pouco competentes em preservar a manutenção da cinética espermática e integridade funcional e estrutural da membrana plasmática pós-congelamento. Dessa forma, sugerimos que mais estudos sejam realizados afim de encontrar uma concentração mais adequada de antioxidantes.

7 REFERÊNCIAS

- ABDEL-EMAM, R. AND AHMED, E. Ameliorative effect of l-carnitine on chronic lead-induced reproductive toxicity in male rats. **Veterinary Medicine and Science**, v.7, 2021. 1426-1435. <https://doi.org/10.1002/vms3.473>
- AGARWAL, A., GUPTA, S., & SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p. 12, 2004. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-12>
- AGARWAL, A., SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **Journal of Andrology**, v.26(6), p. 646-656, 2005.
- ANGRIMANI, D.S.R.; LOSANO, J.D.A.; RUI, B.R.; BICUDO, L.C.; ANDRADE A.F.C.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.39, n.2, p.277-283, 2015.
- AGOSTINHO, A.F.M. **Estudo Sobre a Longevidade Espermática Durante o Transporte em Sêmen Caprino**. Escola Superior de Biociências de Elvas, 2024.
- AGOSTINI LOSANO, J. D.; PARKS, J.; BROMFIELD, J.; DAIGNEAULT, B. Rosiglitazone extends maintenance of frozen-thawed bull sperm for 24 hours at ambient temperature. **Reproduction, fertility, and development**, v. 34, p. 294, 2021. <https://doi.org/10.1071/RDv34n2Ab114>
- AGUIAR, C. S.; BARROS, C. H. S. C.; MACHADO, W. M.; ALLAMAN, I. B.; LEITE, A. O.; BARBOSA, L. P.; SNOECK, P. P. D. N. Effect of different concentrations of Trolox® in association with docosahexaenoic acid on equine semen freezing. **Animal reproduction**, v. 19, e20220010, 2022. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2022-0010>
- AGUIAR, C. S.; BARROS, C. H. S. C.; MACHADO, W. M.; ALLAMAN, I. B.; BARBOSA, L. P.; SNOECK, P. P. N. Efeito do ácido docosa-hexaenoico e do Trolox® no diluidor de refrigeração de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 71-78. 2020.
- ALÇAY, S., TOKER, M., GÖKÇE, E., ÜSTÜNER, B., ONDER, N., SAĞIRKAYA, H., & SOYLU, M. (2015). Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. **Cryobiology**, 71(2), 329-333. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.008>
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIMALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**. v.89, p.105-113, 2005.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of Andrology**, v.8, p. 367-376, 1987.

- AITKEN, R. J. WINGATE, J.K.; DE IULIIS, G.N.; MCLAUGHLIN, E.A. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using bodipy 471 c11. **Molecular human reproduction**, v. 13, p. 203-211, 2007.
- AKANMU, D.; CECCHINI, R.; ARUOMA, O.I.; HALLIWELL, B. The antioxidant action of ergothioneine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.288, p.(1):10-6. 1991.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; NETO, C.R. Técnicas para incremento da qualidade do sêmen de garanhões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.81-85, 2017.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, Volume 7, Issue 3, 1987, Pages 145-173, ISSN 0737-0806, [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4).
- ANDRABI, S.M.H. Fundamental Principles of Cryopreservation of Bos taurus and Bos indicus Bull Spermatozoa. **International Journal Of Agriculture & Biology**, Vol. 9, No. 2, 2007
- ASLAN, M., ASLAN, İ., OZCAN, F., ERYILMAZ, R., ENSARI, C., & BILECIK, T. (2014). A pilot study investigating early postoperative changes of plasma polyunsaturated fatty acids after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Lipids in Health and Disease*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1476-511x-13-62>
- AVIDOR-REISS T, FISHMAN EL. It takes two (centrioles) to tango. **Reproduction**. 2019 Feb;157(2):R33-R51. doi: 10.1530/REP-18-0350. PMID: 30496124; PMCID: PMC6494718.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p. 65-75, 2005.
- BADR, M.A. ; EBTIHAL, IBRAHIM ; DOHREIG, R.M.A. ; HUSSEIN, M.S. ; HASSAN, H.M. (2017). Effects of l-carnitine on morphology and antioxidant enzymes and dna integrity of cryopreserved buffalo spermatozoa. **Assiut Veterinary Medical Journal**, 63(152), 173-182. <https://doi.org/10.21608/avmj.2017.169269>
- BAHMYARI, R., ZARE, M., SHARMA, R., AGARWAL, A., & HALVAEI, I. (2020). The efficacy of antioxidants in sperm parameters and production of reactive oxygen species levels during the freeze-thaw process: a systematic review and meta-analysis. **Andrologia**, 52(3). <https://doi.org/10.1111/and.13514>
- BAHRAMI, A.; DIVAR, M. R.; AZARI, M.; KAFI, M. Nicotinic Acid (Niacin) Supplementation in Cooling and Freezing Extenders Enhances Stallion Semen Characteristics. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.94, 2020.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; Sérgio Oliveira DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n.4, p. 629-643, 2010.

- BAUMBER, J., BALL, B.A., GRAVANCE, C.G., MEDINA, V. and DAVIES-MOREL, M.C.G. (2000), The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm Motility, Viability, Acrosomal Integrity, Mitochondrial Membrane Potential, and Membrane Lipid Peroxidation. **Journal of Andrology**, 21: 895-902. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03420.x>
- BAILEY, J. L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRÈQUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W. Cryopreservation of stallion spermatozoa: effects of sugars and milk on post-thaw motility and fertility. **Theriogenology**, 53(2), 310-320, 2000. DOI: 10.1016/S0093-691X(99)00245-6
- BEDFORD, J.M. 'Enigmas of mammalian gamete form and function', **Biological Reviews**, 79(2), pp. 429–460. 2004. doi:10.1017/S146479310300633X.
- BERAN, J., SIMONIK, O., STÁDNÍK, L., RAJMON, R., DUCHÁČEK, J., KREJCÁRKOVÁ, A., ŠICHTAŘ, J. (2013). Effect of bull, diluter and ldl-cholesterol concentration on spermatozoa resistance against cold shock. **Acta Universitatis Agriculturae Et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, 61(6), 1575-1581. <https://doi.org/10.11118/actaun201361061575>
- BERGERON, A.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Heparin binding proteins of bovine seminal plasma bind to spermatozoa and modulate capacitation by controlling cholesterol efflux. **Biology of Reproduction**, v.72(3), p. 575-583, 2005.
- BENCHARIF, D., AMIRAT, L., PASCAL, O., ANTON, M., SCHMITT, É., DESHERCES, S., TAINTURIER, D. (2010). The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45(2), p.189-200, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01198.x>
- BERAN, J., ŠIMONÍK, O., RAJMON, R., STÁDNÍK, L., DOLEŽALOVÁ, M., KREJCÁRKOVÁ, A., ŠICHTAŘ, J. (2016). Effect of ldl addition into selected bull sperm diluters on resistance of spermatozoa against cold shock. **Acta Universitatis Agriculturae Et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, 64(2), 395-399. <https://doi.org/10.11118/actaun201664020395>
- BONOMETTI, S; MENARIM, B; ORLANDI, C; UBERTI, B; RAMÍREZ-REVECO, A. Sperm-Oviduct Interaction Factors that Compromise Fertility of Frozen Stallion Semen. **Glob J Reprod Med**. 2017; 3(1): 555601. DOI: 10.19080/GJORM.2017.03.555601
- BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; BLANCHARD, T.L.; DAY, B.C.; WILSON, M.E. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion sêmen. **Theriogenology**, v.63, p. 1519-1527, 2005.
- BRITO, T. M. Efeito da LDL associada ao meio BWW na cinemática e integridade de espermatozoides refrigerados de garanhões mangalarga marchador. Dissertação de mestrado. UESC, Ilhéus, 70p. 2022.
- BUÑAY, J.; GALLARDO, L.; TORRES-FUENTES, J.; AGUIRRE-ARIAS, M.; ORELLANA, R.; SEPÚLVEDA, N.; MORENO, R. A decrease of docosahexaenoic acid in testes of mice fed a high-fat diet is associated with impaired sperm acrosome reaction and fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 23(3), p. 306, 2021. https://doi.org/10.4103/aja.aja_76_20

CABRERA, T., RAMIRES-NETO, C., BELAZ, K. R. A., FREITAS-DELL'AQUA, C., ZAMPIERI, D., TATA, A., SOUZA, F. F. D. (2018). Influence of spermatozoal lipidomic profile on the cryoresistance of frozen spermatozoa from stallions. **Theriogenology**, 108, 161-166. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.025>

CANISSO, F.I.; SOUZA, F.A.; DA SILVA, E.C.; CARVALHO, G.R.; GUIMARÃES, J.D.; LIMA, L.A. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 6, n. 3, p. 389–398, 2008. DOI: 10.7213/cienciaanimal.v6i3.10622

CARRARA, J., LEHOTAY, S., SUN, D., RICHIE, J., SMITH, A., & HELLER, W. (2023). Linking soil health to human health: arbuscular mycorrhizae play a key role in plant uptake of the antioxidant ergothioneine from soils. **Plants People Planet**, 5(3), 449-458. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10365>.

CASTRO, C.S.; SANTOS, K.J.G.; SANTOS, A.P.P.; FERRO, R.A.C.; FERRO, D.A.C.; PAULA, R.S.; SANTOS, J.F.D. Aplicação da criopreservação em sêmen equino. **Revista espacios**, v.38, p. 18, 2017.

CHANAPIWAT, P. AND KAEOKET, K. (2021). L-cysteine prolonged fresh boar semen qualities, but not for docosahexaenoic acid. **Czech Journal of Animal Science**, 66(1), 21-28. <https://doi.org/10.17221/199/2020-cjas>

CONNOR, W.E.; NEURINGER, M. The effects of n-3 fatty acid deficiency and repletion upon the fatty acid composition and function of the brain and retina. **Progress in Clinical and Biological Research**. 1988 ;282:275-294. PMID: 3241811.

COSTA, D.N.M.; SILVA, D.A.M.; BOAKARI, Y.L.; FERREIRA, S.B.; MARLON ARAÚJO CASTELO BRANCO, M.A.C.; DE SOUZA, J.A.T. Eficiência dos diluidores tris e botu-crio® sobre os parâmetros seminais de garanhões das raças quarto de milha e mangalarga marchador, **Ciencia Animal Brasileira**, v.15, n.3, p. 322-329, 2014.

CRAIG, L., BRUSH, R., SULLIVAN, M., ZAVY, M., AGBAGA, M., & ANDERSON, R. (2019). Decreased very long chain polyunsaturated fatty acids in sperm correlates with sperm quantity and quality. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 36(7), 1379-1385. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01464-3>

CROCOMO, L.F.; Marques Filho, W.C.M.; Landim-Alvarenga, F.C.; Bicudo, S.D. Produção de embriões in vitro: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 470-479, 2012.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction of Domestic Animals**, v.42, p.479–488. 2007.

CHEN, B., XUE, L., WEI, T., YE, Z., LI, X., GUO, L., LIN, J. (2022). Enhancement of ergothioneine production by discovering and regulating its metabolic pathway in *Cordyceps militaris*. **Microbial Cell Factories**, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01891-5>

- CHEN, L., ZHANG, L., YE, X., DENG, Z., & ZHAO, C. (2023). Ergothioneine and its congeners: anti-ageing mechanisms and pharmacophore biosynthesis. **Protein & Cell**, 15(3), 191-206. <https://doi.org/10.1093/procel/pwad048>
- CHENG, R., LAI, R., PENG, C., LOPEZ, J., LI, Z., NAOWAROJNA, N., LIU, P. (2021). Implications for an imidazole-2-yl carbene intermediate in the rhodanase-catalyzed c–s bond formation reaction of anaerobic ergothioneine biosynthesis. **Acs Catalysis**, 11(6), 3319-3334. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c04886>
- CHENG, R., WU, L., LAI, R., PENG, C., NAOWAROJNA, N., HU, W., LIU, P. (2020). Single-step replacement of an unreactive c–h bond by a c–s bond using polysulfide as the direct
- CHEREST, A., RINALDI, D.; HUNEAU, J. F. The antioxidant role of cysteamine in neuronal protection. **Neurochemistry International**, 136, 104749, 2020. DOI: 10.1016/j.neuint.2020.104749
- CEROLINI, S., MALDJIAN, A., PIZZI, F., & GLIOZZI, T. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen, **Reproduction**, v. 121, p. 395-401, 2001.
- COELHO, C; MOTA, J; BRAGRANÇA, E; BURINI, R. (2005). Aplicações clínicas da suplementação de l-carnitina. **Revista De Nutrição**, 18(5), 651-659. <https://doi.org/10.1590/s1415-52732005000500008>.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ed. Belo Horizonte: CBRA, pp. 104, 2013.
- CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamete Research**, v.15, p.213–226,1986.
- CONSUEGRA, C.; CRESPO, F.; DORADO, J.; DIAZ-JIMENEZ, M.; PEREIRA, B.; HIDALGO, M. Low-density lipoproteins and milk serum proteins improve the quality of stallion sperm after vitrification in straws. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, p. 86-89, 2019.
- CONTRI, A., VALORZ, C., FAUSTINI, M., WEGHER, L., & CARLUCCIO, A. (). Effect of seminal plasma on chilled and frozen-thawed stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, 138(3-4), 242-249. 2013.
- ÇOYAN, K., BUCAK, M., BAŞPINAR, N., TAŞPINAR, M., & AYDOS, S. (2012). Ergothioneine attenuates the dna damage of post-thawed merino ram sperm. **Small Ruminant Research**, 106(2-3), 165-167. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.02.002>
- DAGHIGH KIA H, NAZARI M, EMAMI J. Effect of cysteamine amino acid supplementation on reduced lipid peroxidation rate of rooster sperm during freezing-thawing. **Animal Science Res**. 2021;**31**(3):113-24.
- DÁVILA, M. P., BUCCI, D., GALEATI, G., PEÑA, F. J., MARI, G., GIARETTA, E., SPINACI, M. (2015). Epigallocatechin-3-gallate (egcg) reduces rotenone effect on stallion

sperm–zona pellucida heterologous binding. **Reproduction in Domestic Animals**, 50(6), 1011-1016. <https://doi.org/10.1111/rda.12628>

DI SANTO, M.; TAROZZI, N.; NADALINI, M.; BORINI, A. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. **Advances in Urology**, p. 1-12, 2012.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: Effects on motility parameters and DNA integrity. **Fertility and Sterility**, v.76, p.892-900, 2001.

EASTON, T.G.; VALINSKY, J.E.; REICH, E. Merocyanine 540 as a Fluorescent Probe of Membranes: Staining of Electrically Excitable Cells. **Cell**, v.13, p.475- 486. 1978.

EL-BADRY, D. A.; ABEER, M.; A.; RAWASH, Z.M.; SCHOLKAMY, T.H. Effect of The Addition of Natural and Lyophilized Hen's Egg Yolk, Egg Yolk Plasma and LDL to Semen Extender on the Freezability and DNA Integrity of Arab Stallion Spermatozoa. **Zagazig Veterinary Journal**, v. 43, p. 117-128, 2015.

ENGLER, M., ENGLER, M., PIERSON, D., MOLTENI, L., & MOLTENI, A. (2003). Effects of docosahexaenoic acid on vascular pathology and reactivity in hypertension. **Experimental Biology and Medicine**, 228(3), 299-307. <https://doi.org/10.1177/153537020322800309>

FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen—New challenges. **Reproduction. Domestic in. Animals**. 2009, 44, 336–341.

FELÍCIO, G. B.; PAPA, F.O. **Efeito da substituição da gema de ovo pela lecitina de soja na criopreservação de sêmen equino**. Dissertação de mestrado 2008.

FLESCH, FM.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim Biophys Acta**. 2000 Nov 10;1469(3):197-235. doi: 10.1016/s0304-4157(00)00018-6. PMID: 11063883.

FRANÇA, C., BEZERRA, P., MENDES, C., ROCHA, L., SANTANA, A., SOUZA, R., BARBOSA, L. (2021). Docosahexaenoic acid associated vitamin e in the diluent for cryopreservation of goat semen. **Semina Ciências Agrárias**, 42(1), 255-266. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n1p255>

FREITAS, B; SILVA, J; SANTOS, D; AURELIANO, É; LIMA, A; SILVA, R; JÚNIOR, E. (2023). Ácido α -lipóico e l-arginina na produção in vitro de embriões ovinos. <https://doi.org/10.1590/scielopreprints.6001>

FERNANDES, D.R.A.; GADELHA, C.A.G.; MALDONADO, J.M.S.V. O papel dos produtores públicos de medicamentos e ações estratégicas na pandemia da Covid-19. **Saúde debate**, v. 46, n. 132, P. 13-29, 2022.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v.1469(3), p.197-235, 2000.

GAHL, W. A.; THOENE, J. G.; SCHNEIDER, J. A. Cystinosis. *The New England journal of medicine*, v. 347, p. 111–121, 2002. <https://doi.org/10.1056/NEJMra020552>

GARCÍA, M. A.; GRAHAM, J. K.; & FOOTE, R. H. Effect of cryoprotectants and seminal plasma on the survival of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.32(6), p. 320-326, 2012. DOI: 10.1016/j.jevs.2011.09.004

GARCÍA, B. M.; C. ORTEGA FERRUSOLA, I.M. APARICIO, A. MIRÓ-MORÁN, A. MORILLO RODRIGUEZ, J.M. GALLARDO BOLAÑOS, L. GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, C.M. BALAO DA SILVA, H. RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, J.A. TAPIA, F.J. PEÑA. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: Effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology*, Volume 77, Issue 7, Pages 1280-1289, 2012, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.033>.

GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, R. J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human reproduction (Oxford, England)*, v.26, p. 1628–1640, 2011. <https://doi.org/10.1093/humrep/der132>

GIBB, Z.; AITKEN, R.J. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. *BioMed Research International*, v.2016, 2016.

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

GOMES, M.G.T.; ROSANOVA, C.; BEZERRA, A.C.S. Arranjo produtivo local e o agronegócio do cavalo Mangalarga Marchador no estado do Tocantins. *Brazilian Journal of Development*, v.7, n.2, p. 15390-15410, 2021.

GONZÁLEZ-RAVINA, C., AGUIRRE-LIPPERHEIDE, M., PINTO, F., MARTÍN-LOZANO, D., SÁNCHEZ, M., BLASCO, V.; CANDENAS, L. (2018). Effect of dietary supplementation with a highly pure and concentrated docosahexaenoic acid (dha) supplement on human sperm function. *Reproductive Biology*, 18(3), 282-288. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.06.002>

GOTTARDI, F., BARRETTO, L., GONÇALVES, F., PERRI, S., & MINGOTI, G. (2012). Efeito das células do cumulus e cisteamina durante o cultivo de maturação in vitro de oócitos bovinos sobre a maturação nuclear e aquisição da competência para desenvolvimento embrionário. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 64(2), 245-252. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352012000200001>

GOULD, J., ROBERTS, R., & MAKRIDES, M. (2021). The influence of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, docosahexaenoic acid, on child behavioral functioning: a review of randomized controlled trials of dha supplementation in pregnancy, the neonatal period and infancy. *Nutrients*, 13(2), 415. <https://doi.org/10.3390/nu13020415>

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Estresse oxidativo e proteção contra espécies reativas de oxigênio no embrião pré-implantação e seu entorno. *Atualização do Hum Reprod.* 2001;7(2):175-89. <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>

GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.D.; CARMO, M.T.; DELLAQUA JUNIOR, J.A. Pentoxifylline effects on capacitation and fertility of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*,179: 27-34, 2017.

- HACHEM, M., GÉLOËN, A., VAN, A., FOUMAUX, B., FÉNART, L., GOSSELET, F., ... & BERNOUD-HUBAC, N. (2015). Efficient docosahexaenoic acid uptake by the brain from a structured phospholipid. **Molecular Neurobiology**, 53(5), 3205-3215. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9228-9>
- HALLSTEN, K.; VIRTANEN, K.A.; LONNQVIST, F.; SIPILA, H.; OKSANEN, A.; VILJANEN, T.; RONNEMAA, T.; VIIKARI, J.; KNUUTI, J.; NUUTILA, P. Rosiglitazone but not metformin enhances insulin- and exercise-stimulated skeletal muscle glucose uptake in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, p.3479–3485, 2002.
- HAO, Y., FENG, Y., YAN, X., CHEN, L., ZHONG, R., TANG, X., ZHAO, Y. (2022). Gut microbiota-testis axis: fmt improves systemic and testicular micro-environment to increase semen quality in type 1 diabetes. **Molecular Medicine**, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00473-w>
- HE, C., QU, X., CUI, L., WANG, J., & KANG, J. (2009). Improved spatial learning performance of fat-1 mice is associated with enhanced neurogenesis and neuritogenesis by docosahexaenoic acid. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES**, 106(27), 11370-11375. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904835106>
- HIRUNPANICH, V., KATAGI, J., SETHABOUPPHA, B., & SATO, H. (2005). Demonstration of docosahexaenoic acid as a bioavailability enhancer for cyp3a substrates: in vitro and in vivo evidence using cyclosporin in rats. **Drug Metabolism and Disposition**, 34(2), 305-310. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.007088>
- HOOGEWIJS, M., MORRELL, J., SOOM, A., GOVAERE, J., JOHANNISSON, A., PIEPERS, S., VliegHER, S. (2011). Sperm selection using single layer centrifugation prior to cryopreservation can increase thawed sperm quality in stallions. **Equine Veterinary Journal**, 43(s40), 35-41. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00489.x>
- HOEK, S., DARBANI, B., ZUGAJ, K., PRABHALA, B., BIRON, M., RANDELOVIC, M., ... & BORODINA, I. (2019). Engineering the yeast *saccharomyces cerevisiae* for the production of l-(+)-ergothioneine. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00262>
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p.47-58, 2000.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00152-4.
- HORAKOVA, O.; MEDRIKOVA, D.; VAN SCHOTHORST, E. M.; BUNSCHOTEN, A.; FLACHS, P.; KUS, V.; KOPECKY, J. Preservation of metabolic flexibility in skeletal muscle by a combined use of n-3 PUFA and rosiglitazone in dietary obese mice. **PLoS One**, 2012.
- IIZUKA-HISHIKAWA, Y., HISHIKAWA, D., SASAKI, J., TAKUBO, K., GOTO, M., NAGATA, K., SHIMIZU, T. (2017). Lysophosphatidic acid acyltransferase 3 tunes the membrane status of germ cells by incorporating docosahexaenoic acid during

spermatogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.292(29), p. 12065-12076, 2017. <https://doi.org/10.1074/jbc.m117.791277>

ILICETO, M., STENSEN, M., ANDERSEN, J., HAUGEN, T., WITCZAK, O. (2022). Levels of l-carnitine in human seminal plasma are associated with sperm fatty acid composition. **Asian Journal of Andrology**, 24(5), 451. <https://doi.org/10.4103/aja2021107>

ILICETO, M.; ANDERSEN, M.; STENSEN, H.M.; HAUGEN, B.T.; WITCZAK, O. (2024). Association of endogenous seminal l-carnitine levels with post-thaw semen parameters in humans. **Andrologia**, 2024, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2024/4327010>

ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; KATKOV, I.I.; MONTAG, M.; DESSOLE, S.; NAWROTH, F.; VAN DER VEN, H. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. **Biology of Reproduction**, v. 71, p.1167-73, 2004. doi: 10.1095/biolreprod.104.028811.

INABA K. Molecular architecture of the sperm flagella: molecules for motility and signaling. *Zoolog Sci.* 2003 Sep;20(9):1043-56. doi: 10.2108/zsj.20.1043. PMID: 14578564.

INNIS, S. (2003). Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Pediatrics**, 143(4), 1-8. [https://doi.org/10.1067/s0022-3476\(03\)00396-2](https://doi.org/10.1067/s0022-3476(03)00396-2)

IZHAM, I., AVIN, F., & RASEETHA, S. (2022). Systematic review: heat treatments on phenolic content, antioxidant activity, and sensory quality of malaysian mushroom: oyster (*pleurotus* spp.) and black jelly (*auricularia* spp.). *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 6. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.882939>

JACYNO, E., KOŁODZIEJ, A., KAMYCZEK, M., KAWECKA, M., DZIADEK, K., & PIETRUSZKA, A. (2007). Effect of l-carnitine supplementation on boar semen quality. **Acta Veterinaria Brno**, 76(4), 595-600. <https://doi.org/10.2754/avb200776040595>

KAEWMA, S. (2024). Effects of ergothioneine supplementation on the quality of liquid-preserved and frozen-thawed boar semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, 71(3-4), 219-222. <https://doi.org/10.1556/004.2023.00954>

KAEOKET, K., SANG-URAI, P., THAMNIYOM, A., CHANAPIWAT, P., & TECHAKUMPHU, M. (2010). Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. **Reproduction in Domestic Animals**, 45(3), 458-463. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01239.x>

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Effect of semen extenders on equine sperm viability. **Theriogenology**, v.150, p. 96-102, 2020.

KOCHHAR, S. P. **Sesame, rice-bran and flaxseed oils**. In: GUNSTONE, F.D. (Ed.). 44 Vegetable oils in food technology: composition, properties and uses. Florida: Blackwell, 45 2002.

KRAWETZ, S. PATERNAL CONTRIBUTION: NEW INSIGHTS AND FUTURE CHALLENGES. *Nat Rev Genet* **6**, 633–642 (2005). <https://doi.org/10.1038/nrg1654>

KERLEY, R., MCCARTHY, C., KELL, D., & KENNY, L. (2018). The potential therapeutic effects of ergothioneine in pre-eclampsia. *Free Radical Biology and Medicine*, **117**, 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.030>

KORDAN, W., FRASER, L., WYSOCKI, P., STRZEŻEK, R., LECEWICZ, M., MOGIELNICKA-BRZOZOWSKA, M., ... & KOZIOROWSKA-GILUN, M. (2013). Semen quality assessments and their significance in reproductive technology. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, **16**(4), 823–833. <https://doi.org/10.2478/pjvs-2013-0117>

LANÇONI, R., CELEGHINI, E. C. C., GIULI, V. D., CARVALHO, C. P. T. D., ZOCCA, G. B., GARCIA-OLIVEROS, L. N., ARRUDA, R. P. D. (2021). Coenzyme q-10 improves preservation of mitochondrial functionality and actin structure of cryopreserved stallion sperm. *Animal Reproduction*, **18**(1). <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2020-0218>

LANGNER, M.; HUI, S.W. Merocyanine interaction with phosphatidyl choline bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1149, p.175–179. 1993.

LEITE, C. L.; SILVA L.P.; PAZZINI, H.B.; LOBATO, S.I.R.; BORGES, L.P.; REIS, Y.S.; GOMES-SILVA, L.; RIBEIRO, C.S.; VERÍSSIMO-SILVEIRA, R.; NINHAUS-SILVEIRA, A. Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation of *Astyanax lacustris* males on semen quality. *Neotrop Ichthyol*. v.21, p.(3):e230077, 2023. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2023-0077>

LENNON, R., WELSH, G. I., SINGH, A., SATCHELL, S. C., COWARD, R. J., TAVARE, J. M., SALEEM, M. A. Rosiglitazone enhances glucose uptake in glomerular podocytes using the glucose transporter GLUT1. *Diabetologia*, v. 52, n. 9, p. 1944–1952, 2009.

LEEMANS, B., GADELLA, B., STOUT, T., ŠOŠTARIĆ, E., SCHAUWER, C., NELIS, H., SOOM, A. (2016). Combined albumin and bicarbonate induces head-to-head sperm agglutination which physically prevents equine sperm–oviduct binding. *Reproduction*, **151**(4), 313–330. <https://doi.org/10.1530/rep-15-0471>

LETRO, C., ARAUJO, B., GAZZONI, G., MIRANDA, G., HUBINGER, G., DEBOSSAN, L.; GARDONE, D. (2021). Ômega-3 e doenças cardiovasculares: uma revisão à luz das atuais recomendações. *Revista Eletrônica Acervo Científico*, **26**, e7398. <https://doi.org/10.25248/reac.e7398.2021>

LI, R., YANG, C., SIT, A., KWAN, Y., LEE, S., HOI, M.; LEUNG, G. Uptake and protective effects of ergothioneine in human endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **350**(3), 691–700, 2014. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.214049>

LIBRADO, P.; KHAN, N.; FAGES, A. The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes. *Nature*, n. 598, p. 634–640, (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04018-9>

LOBO, M. E. A.; LONDOÑO, G. C.; ROJANO, B. A.; BETANCUR, G. R. Effect of quercetin, L-ergothioneine and H89 on sperm motility and kinematic pattern, plasma membrane functionality and in vitro heterologous fertilizing capacity of cryopreserved equine

semen. **Journal of equine veterinary science**, v.133, p.105013, 2024.
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2024.105013>

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. "**Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.22(3), p. 663-676, 2006.
 DOI: 10.1016/j.cveq.2006.08.002

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. 1-2, p. 119-128, 2008.

LOSANO, J., ANGRIMANI, D., RUI, B., BICUDO, L., DALMAZZO, A., SILVA, B., NICHI, M. (2018). The addition of docosahexaenoic acid (dha) and antioxidants (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) in extenders to epididymal sperm cryopreservation in bulls. **Zygote**, 26(3), 199-206. <https://doi.org/10.1017/s0967199418000096>

MACHADO, W. M.; BRITO, T. M.; SANTANA, L. R.; KERSUL, M. G.; SNOECK, P. P. NEVES. Sêmen equino refrigerado com diluidor quimicamente definido contendo lecitina de soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 43(6), p. 2743–2754, 2023.
<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2022v43n6p2743>

MACÍAS-GARCÍA, B.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; GALLARDO-BOLAÑOS, J.M.; PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; MORRELL, J.M. Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. **Animal Reproduction Science**, v. 132, p. 74-82, 2012.

MANNA, S., MCCARTHY, C., & MCCARTHY, F. (2019). Placental ageing in adverse pregnancy outcomes: telomere shortening, cell senescence, and mitochondrial dysfunction. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019, 1-11.
<https://doi.org/10.1155/2019/3095383>

MANN, T., LUTWAK-MANN, C., MANN, T., & LUTWAK-MANN, C. Male reproductive function and the composition of semen: general considerations. **Male Reproductive Function and Semen: Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology**, v.1, p.37, 1981.

MAHNAZ, K. J.; ATHAR, R. J.; MARZIEH, K. J.; MARZEYEH, L.] Comparison of the Effects of Nettle and Alyssum with Q10 Plus and L-Carnitine on Improving Sperm Parameters of Infertile Men. **Bangladesh Journal of Medical Science**, v.23, (2),p. 398–406, 2024. <https://doi.org/10.3329/bjms.v23i2.72153>

MARC, I., BOUTIN, A., PRONOVOST, É., HERRERA, N., GUILLOT, M., BERGERON, F., MAKRIDES, M. Association between enteral supplementation with high-dose docosahexaenoic acid and risk of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. **Jama Network Open**, 6(3), e233934. 2023.<https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.3934>

MARC, I., LAVOIE, P., MCPHEE, A., COLLINS, C., SIMONYAN, D., PRONOVOST, É; MAKRIDES, M. Enteral supplementation with high-dose docosahexaenoic acid on the risk of bronchopulmonary dysplasia in very preterm infants: a collaborative study protocol for an

individual participant data meta-analysis. **BMJ Open**, v.13, p. e076223, 2023.
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2023-076223>

MARTÍNEZ-SOTO, J., DOMINGO, J., CORDOBILLA, B., NICOLÁS, M., FERNÁNDEZ, L., ALBERO, P., LANDERAS, J. Dietary supplementation with docosahexaenoic acid (DHA) improves seminal antioxidant status and decreases sperm DNA fragmentation. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v.62, p. 387-395, 2016.
<https://doi.org/10.1080/19396368.2016.1246623>

MARTÍNEZ-SOTO, J. C.; DOMINGO, J.; CORDOBILLA, B.; NICOLÁS, M.; FERNÁNDEZ, L.; ALBERO, P.; GARCÍA-PEIRÓ, A. Human sperm cryopreservation: A systematic study regarding the function and markers of capacitation. **Andrology**, v.4, p. 1051-1063, 2016.

MANJUNATH, P.; THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v.53(1-2), p.109-119, 2002.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender componentes. **Animal Reproduction**, v.9, n.4, p.809-815, 2012.

MANN, T., SHORT, R., WALTON, A., ARCHER, R., & MILLER, W. The 'tail-end sample' of stallion semen. **The Journal of Agricultural Science**, v.49(3), p.+301-312, 1957..
<https://doi.org/10.1017/s0021859600038284>

MANEE-IN, S., PARMORNSUPORNVICHIT, S., KRAIPRAYOON, S., THARASANIT, T., CHANAPIWAT, P., & KAEOKET, K. L-carnitine supplemented extender improves cryopreserved-thawed cat epididymal sperm motility. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 27(6), 791-796, 2014. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13565>

MARTIN, CARLOS EDUARDO GOMEZ , JOÃO CARLOS DESCHAMPS, THOMAZ LUCIA JR, CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA, BRUNA DA ROSA CURCIO, FRIEDRICH FREY JR, CINTHIA TRURAM MENDONÇA, RAMIRO MADRUGA COSTA³. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides equinos submetidos a criopreservação. 2005

MARTINS, C. F.; SILVA, E. C. B.; SANTOS, D. C. C. Criopreservação de sêmen: Aspectos básicos e aplicados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 370-380, 2007.

MARCONATO, T.C.; DONNE, R.D.D.; ROMANO, R.M.; ROMANO, M.A. Infertilidade masculina: principais causas e terapêuticas emergentes, uma revisão, **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, e405111033139, 2022.

MATYUS, L.; SZABÓ, G. JR.; RESLI, I.; GÁSPÁR, R. JR.; DAMJANOVICH, S. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. **Biochimicaet Biophysica Acta**, v.19, p.209-214, 1984.

MATSUDA, Y., OZAWA, N., SHINOZAKI, T., WAKABAYASHI, K., SUZUKI, K., KAWANO, Y.; TATEBAYASHI, Y. Ergothioneine, a metabolite of the gut bacterium

Lactobacillus reuteri, protects against stress-induced sleep disturbances. **Translational Psychiatry**, v. 10, n1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0855-1>

MÁXIMO, M.G.C. **Comparação de dois diluidores comerciais em parâmetros de qualidade no sémen equino em diferentes tempos**, Escola Superior Agrária de Elvas, 2022.

MAZUR, P. Principles of Cryobiology. **Cellular Cryobiology**, v.48(3), p. 252-258, 2004.

MEDICA, A. J.; AITKEN, R. J.; NICOLSON, G. L.; SHERIDAN, A. R.; SWEGEN, A.; DE IULIIS, G. N.; GIBB, Z. Glycerophospholipids protect stallion spermatozoa from oxidative damage *in vitro*. **Reproduction & fertility**, v.2, n.3, p.199–209. 2021.

MEDEIROS A, GOMES G, CARMO, PAPA F, ALVARENGA M. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology** ,v.58, p. 273-276, 2002. doi: 10.1016/S0093-691X(02)-00898-1

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

MEHDIPOUR, M.; DAGHIGH-KIA, H.; NAJAFI, A.; MEHDIPOUR, Z.; MOHAMMADI, H. Protective effect of rosiglitazone on microscopic and oxidative stress parameters of ram sperm after freeze-thawing. **Scientific reports**, v.12, p. 13981, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18298-2>

MESA, A.; HENAO, G. Effect of cholesterol and dimethyl-formamide on post-thawing parameters in Colombian creole stallion sperm. **Revista MVZ Córdoba**, v.17, p.: 2908-2915, 2012.

MEYERS S, BULKELEY E, FOUTOUHI A. Sperm mitochondrial regulation in motility and fertility in horses. **Reproduction Domestic Animals**. 2019 Sep;54 Suppl 3:22-28. doi: 10.1111/rda.13461. PMID: 31512320

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCOS, C.M. Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. **Theriogenology** 2008, 70, 827–835

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

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

MORENO, D.; BENCHARIF, D.; AMIRAT-BRIAND, L.; NEIRA, A.; DESTROMELLE, S.; TAINTURIER, D. Preliminary Results: The Advantages of Low-Density Lipoproteins for the Cryopreservation of Equine Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, 33, 1068-1075, 2013.

MORRELL, J. M., RICHTER, J., MARTINSSON, G., STUHTMANN, G., HOOGEWIJS, M., ROELS, K., ... & DALIN, A. (2014). Pregnancy rates after artificial insemination with cooled stallion spermatozoa either with or without single layer centrifugation. **Theriogenology**, 82(8), 1102-1105. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.028>

MOTTIN, M. & SKAF, M. **Simulações de dinâmica molecular do receptor ativador da proliferação de peroxissomos y com o agonista parcial** gq16. Dissertação de mestrado. UNICAMP, Campinas, SP, 2012). <https://doi.org/10.47749/t/unicamp.2012.856369>

MOURVAKI, E.; CARDINALI, R.; DAL BOSCO, A.; CASTELLINI, C. Effects of DHA and vitamin E on spermatozoa viability in rabbit semen. **Animal Reproduction Science**, 118(3-4), 356-361, 2010.

MURPHY, E., STANTON, C., O'BRIEN, C., MURPHY, C., HOLDEN, S., MURPHY, R., FAIR, S. (2016). The effect of dietary supplementation of algae rich in docosahexaenoic acid on boar fertility. **Animal Reproduction Science**, 169, 110. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.03.041>

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. Low-density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.57(6), p.1695-1706, 2002.

NADA, E., TAIEB, M., IBRAHIM, H., & SAIED, A. (2014). Efficacy of tamoxifen and l-carnitine on sperm ultrastructure and seminal oxidative stress in patients with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. **Andrologia**, 47(7), 801-810. <https://doi.org/10.1111/and.12333>

NAJAFI, A., KIA, H., MOHAMMADI, H., NAJAFI, M., ZANGANEH, Z., SHARAFI, M., ADEL DUST, H. (2014). Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. **Cryobiology**, 69(1), 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.05.004>

NAOWAROJNA, N., IRANI, S., HU, W., CHENG, R., ZHANG, L., LI, X.; LIU, P. Crystal structure of the ergothioneine sulfoxide synthase from *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum* and structure-guided engineering to modulate its substrate selectivity. **Acs Catalysis**, 9(8), 6955-6961, 2019. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b02054>

O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility, and mitochondrial function. **Human Reproduction**, 17(3), 704-709, 2002.

OLIVEIRA, L.Z. et al. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. **Livestock Science**, v.146, p.38-46, 2012.

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

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACÍAS, G.B.; RODRÍGUEZ, M. H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces “apoptosis like” changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 74, p. 458-465. 2010.

ORTIZ-RODRÍGUEZ, J. M.; MARTÍN-CANO, F. E.; GAITSKELL-PHILLIPS, G. L.; SILVA, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GIL, M. C.; PEÑA, F. J. Low glucose and high pyruvate reduce the production of 2-oxoaldehydes, improving mitochondrial efficiency, redox regulation and stallion sperm function. **Biology of Reproduction**, v.105, p.519-532, 2021.

PAIVA, C.P.R. **Vias metabólicas e funcionalidade de espermatozóides** humanos, 2010.

PAPA, F. O.; MELO, C. M.; ALVARENGA, M. A.; TRINQUE, C. M. Evaluation of cryopreservation protocols for stallion spermatozoa using different cryoprotectants. **Theriogenology**, v.76(8), p. 1426-1432, 2011. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.06.020

PAPA, F. O, FELÍCIO, G. B.; MELO-OÑA, C. M.; ALVARENGA, M. A.; DE VITA, B.; TRINQUE, C.; PUOLI-FILHO, J. N.; DELL'AQUA, J. A. JR. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 13 129, p. 73-77, 2011.

PARTYKA, A.; NIŻAŃSKI, W.; OCHOTA, M. AŁGORZATA. Methods of assessment of cryopreserved semen. *Methods of Assessment of Cryopreserved Semen*. In: KATKOV, I. 570 (Ed.). *Current Frontiers in Cryobiology*, cap. 20, p.547-574, 2012.

PAYAN-CARREIRA, R. **Success in Artificial Insemination** – Quality of Semen and Diagnostics Employed. Rijeka, Croácia., cap. 6, p.93-115, 2013.

PARSLEY, M., WILSON, M., GALL, T., & BALLARD, M. (2021). Effect of stabilized fish oil source on sperm quality and production of boars. **Open Journal of Animal Sciences**, 11(02), 197-207. <https://doi.org/10.4236/ojas.2021.112015>

PERUMAL, P., SRIVASTAVA, S., BARUAH, K., RAJORIYA, J., & SRIVASTAVA, N. (2016). Low density lipoprotein on poor quality mithun (*bos frontalis*) semen preservation. **Indian Journal of Animal Research**, (OF). <https://doi.org/10.18805/ijar.v0iof.4568>

PERUMAL, P., SRIVASTAVA, S., GHOSH, S., BARUAH, K., BAG, S., RAJORIA, J., SRIVASTAVA, N. (2016). Effects of low-density lipoproteins as additive on quality parameters and oxidative stress following cryopreservation of mithun (*bos frontalis*) spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, 51(5), 708-716. <https://doi.org/10.1111/rda.12735>

PILLET, E.; DUCHAMP, G.; BATELLIER, F. Egg yolk plasma and low-density lipoproteins efficiently preserve stallion sperm viability in liquid storage at 4°C. **Theriogenology**, v.78(6), p.1066-1074, 2012.

PILLET E, DUCHAMP G, BATELLIER F, BEAUMAL V, ANTON M, DESHERCES S, SCHMITT E, MAGISTRINI M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**. 1;75(1):105-14, 2011. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.07.015.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. D.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Malvern: Lea & Febiger., p. 769-789, 1993.

PINTUS, E. AND ROS-SANTAELLA, J. Impact of oxidative stress on male reproduction in domestic and wild animals. **Antioxidants**, 10(7), 1154, 2021..
<https://doi.org/10.3390/antiox10071154>

PISONI, R. L.; PARK, G. Y.; VELILLA, V. Q.; THOENE, J. G. Detection and characterization of a transport system mediating cysteamine entry into human fibroblast lysosomes. Specificity for aminoethylthiol and aminoethylsulfide derivatives. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, p.1179–1184, 1995. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.3.1179>

POCHINI L, GALLUCCIO M, SCALISE M, CONSOLE L, PAPPACODA G, INDIVERI C. OCTN1: A Widely Studied but Still Enigmatic Organic Cation Transporter Linked to Human Pathology and Drug Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p.914, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23020914>

PRAPAIWAN, N., THARASANIT, T., PUNJACHAIPORNPOL, S., YAMTANG, D., ROONGSITTHICHAJ, A., MOONARMART, W., MANEE-IN, S. (2015). Low-density lipoprotein improves motility and plasma membrane integrity of cryopreserved canine epididymal spermatozoa. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 29(5), 646-651. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0572>

RAMÍREZ-AGÁMEZ, L., HERNÁNDEZ-AVILÉS, C., ORTIZ, I., LOVE, C. C., VARNER, D., & HINRICHS, K. (2023). Lactate as the sole energy substrate induces spontaneous acrosome reaction in viable stallion spermatozoa. **Andrology**, 12(2), 459-471. <https://doi.org/10.1111/andr.13479>

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65(2), p. 462-470, 2001.

RICCI, G.; PERTICARARI, S.; FRAGONAS, E.; GIOLO, E.; CANOVA, S.; POZZOBON, C.; GUASCHINO, S.; PRESANI, G. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. **Human Reproduction**. v. 17, p. 2665-2672, 2002.

RIBEIRO, L. C.; ALMEIDA, O. C.; EICHLER, V.; WASHECK, R. C. Bem estar e desempenho do cavalo atleta. Disponível em <https://repositorio.pucgoias.edu.br/jspui/handle/123456789/494>

RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; PELÚZO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.B. A formação e efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, C., MONZÓ, C., & YAÑEZ-MÓ, M. Lipid metabolism and membrane fluidity in sperm function. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 6, 109, 2018.

ROOKE, J.A.; SHAO, C.C.; SPEAKE, B.K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. **Reproduction**, 121, 315–22, 2001.

SABEUR, K. AND BALL, B. (2007). Characterization of nadph oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. **Reproduction**, 134(2), 263-270. <https://doi.org/10.1530/rep-06-0120>

SALIH, S., KIA, H., MEHDIPOUR, M., & NAJAFI, A. (2021). Does ergothioneine and thawing temperatures improve rooster semen post-thawed quality? **Poultry Science**, 100(10), 101405. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101405>

SAFARINEJAD, M. (2010). Effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on semen profile and enzymatic anti-oxidant capacity of seminal plasma in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a double-blind, placebo-controlled, randomised study. **Andrologia**, 43(1), 38-47. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.01013.x>

SAMPAIO, B. F. B. **Adição de lipídeos ao diluente de congelação de sêmen de garanhões**. 2012. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

SAMPER, J. C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 219-228, 2001.

SANTANA, L.R.; MACHADO, W.M.; ABREU, B.A.; MENDES, K.S.S.; ALLAMAN, I.B.; PAOLA PEREIRA DAS NEVES SNOECK, P.P.N. Inclusion of ergothioneine and cysteamine in equine semen cryopreservation extender results in a significant reduction in sperm movement parameters. **Anais da VIII Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal**, 2024.

SICHERLE, C.C.; SOUZA, F.F.; FREITASDELL'AQUA, C.P.; MOTHÉ, G.B.; PADOVANI, C.R.; PAPA, F.O.; LOPES, M. D. Effects of the cryopreservation process on dog sperm integrity. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 1, 2020.

SIEME, H.; HARRISON, R.A.P.; PETRUNKINA, A.M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.276-292, 2008.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 958-978, 2006.

SILVA, W.J.M.; CARLOS KUSANO BUCALEN FERRARI, C.K.B. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, 2011; v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

SILVA, E.O.; AZEVEDO, I.A.; MARQUES, M.C.S. A utilização do cavalo em paciente com transtorno do espectro autista: uma revisão integrativa. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 4, p. 3719-3728, 2019.

SOTGIA, S.; TARAS, A.; ZINELLU, A.; CHERCHI, R.; MANGONI, A.A.; CARRU, C.; BOGLIOLO, L. Hercynine, Ergothioneine e Redox State em Stallion's Seminal Plasma. **Antioxidantes (Basileia)**, v.9, p.(9):855, 2020.

SHINDOU, H., KOSO, H., SASAKI, J., NAKANISHI, H., SAGARA, H., NAKAGAWA, K.; SHIMIZU, T. (2017). Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. **Journal of Biological Chemistry**, 292(29), 12054-12064. <https://doi.org/10.1074/jbc.m117.790568>

SHEWEITA, S., TILMISANY, A., & AL-SAWAF, H. (2005). Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. **Current Drug Metabolism**, 6(5), 495-501. <https://doi.org/10.2174/138920005774330594>

SILVA, R. R. O; MERFELS, C. A.; PALMA, M. S. A.; "SÍNTESE DA ROSIGLITAZONA EM FLUXO EM MICRORREATOR CAPILAR", p. 2440-2443 . In: . São Paulo: **Blucher**, 2018. ISSN 2359-1757, DOI 10.5151/cobeq2018-PT.0646

SIEME H, OLDENHOF H, WOLKERS WF. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. **Reproduction Domestic Animal**. 2015 Sep;50 Suppl 3:20-6. doi: 10.1111/rda.12594. PMID: 26382025

SHARAFI, M; BORGHEI-RAD, S; HEZAVEHEI, M; SHAHVERDI, A; BENSON, J. (2022). Cryopreservation of semen in domestic animals: a review of current challenges, applications, and prospective strategies. **Animals**, 12(23), 3271. <https://doi.org/10.3390/ani12233271>

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

SNOECK, P.P.D.N.; PESSOA, T.H.O.; PEREIRA, M.G.S.; BASTOS, I.C.L.; DE MELO, M.I.V. Can we use LDL instead of egg yolk in BotuCrio® extender to cryopreserve sperm from the Mangalarga Marchador stallion? **Animal Reproduction**, v. 23;16(2), p.340-347, 2019. doi: 10.21451/1984-3143-AR2019-0039.

SONG GJ, LEWIS V. Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertil Steril*. 2008 Dec;90(6):2238-44. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.10.059. Epub 2008 Feb 4. PMID: 18249386.

SQUIRES, E. L.; BARBACINI, S., NECCHI, D., REGER, H. P., BRUEMMER, J. E.. Simplified Strategy for Insemination of Mares with Frozen Semen. **American Association of Equine Practitioners**, 2003.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**. v.62(6):p. 1056-65, 2004. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.12.024. PMID: 15289047.

SUAREZ, A., TEJERA, I., GÓMEZ, J., RESTREPO, O., ROJANO, B., & BETANCUR, G. (2021). Cryoprotective effects of ergothioneine and isoespintanol on canine semen. **Animals**, 11(10), 2757. <https://doi.org/10.3390/ani11102757>

SWEGEN, A.; LAMBOURNE, S. R.; AITKEN, R. J.; GIBB, Z. Rosiglitazone Improves Stallion Sperm Motility, ATP Content, and Mitochondrial Function, **Biology of Reproduction**, v. 95, p. 1-12, 2016.

TA, P., BUCHMEIER, N., NEWTON, G., RAWAT, M., & FAHEY, R. (2011). Organic hydroperoxide resistance protein and ergothioneine compensate for loss of mycothiol in mycobacterium smegmatis mutants. **Journal of Bacteriology**, 193(8), 1981-1990. <https://doi.org/10.1128/jb.01402-10>

TERRACIANO, P.B.; FILHO, B.C.I.; MIQUELITOL, L.V.; ARLAS, T.R.; MATTOS, F.C. Cryopreservation of equine spermatozoa comparing different freezing rates combined with commercial extenders: laboratorial analysis. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1972-1977, 2008.

THANANURAK, P., CHUAYCHU-NOO, N., THÉLIE, A., PHASUK, Y., VONGPRALUB, T.; BLESBOIS, E. Different concentrations of cysteamine, ergothioneine, and serine modulate quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperm. **Poultry science**, v. 99, p. 1185–1198, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.10.040>

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biology of Reproduction**, v. 61(3), p.768-776, 1999.

THURMOND, D.; PESSIN, J. Discrimination of GLUT4 vesicle trafficking from fusion using a temperature-sensitive Munc18c mutant. **The EMBO journal**, v.19, p. 3565-75. [10.1093/emboj/19.14.3565](https://doi.org/10.1093/emboj/19.14.3565).

TIAN, X., CIOCCOLONI, G., NASEEM, K., THORNE, J., & MOORE, J. (2021). Ergothioneine supplementation in people with metabolic syndrome (ergms): protocol for a randomised, double-blind, placebo-controlled pilot study. **Pilot and Feasibility Studies**, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40814-021-00929-6>

TIAN, X., THORNE, J., & MOORE, J. (2023). Ergothioneine: an underrecognised dietary micronutrient required for healthy ageing?. **British Journal of Nutrition**, 129(1), 104-114. <https://doi.org/10.1017/s0007114522003592>

TORRES-RUDA, F; MANJARREZ, C; CARVAJAL-SERNA, M; LOMBANA, H. (2019). Efecto de la adición de antioxidantes en los diluyentes para la preservación de semen ovino. **Revista De Medicina Veterinaria**, 1(38), 1-9. <https://doi.org/10.19052/mv.vol1.iss38.9>

TOLOSA, M. **Efecto de drogas antidiabéticas sobre la diferenciación de células progenitoras de médula ósea y la microarquitectura de tejido óseo de rata**. Tese de doutorado. Universidade Nacional de La Prata, 2013 <https://doi.org/10.35537/10915/36972>

USUGA, A., TEJERA, I., GÓMEZ, J., RESTREPO, O., ROJANO, B., & RESTREPO, G. Cryoprotective Effects of Ergothioneine and Isoespiritanol on Canine Semen. **Animals**, v.11,p. 2757, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11102757>

VARELA, A., CORCINI, C., ULGUIM, R., ALVARENGA, M., BIANCHI, I., CORRÊA, M., DESCHAMPS, J. (2009). Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science**, 115(1-4), 323-327. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.11.002>

VALENTINA, I.; RESTREPO-ROJAS, A.; BETANCUR, O.R.; OQUENDO, G.G.; JORGE, E. Congelación de semen canino en presencia de isoespiritanol y ergotioneína: efecto sobre la calidad espermática posdescongelación. Disponible em: <https://repository.ces.edu.co/handle/10946/53312021>

VARNER, D. D., GIBB, Z., AITKEN, R. J., NIEUWENHOF, H., BAKER, M. A., & HETZEL, D. J. Biological mechanisms of cryopreservation damage in equine sperm and

approaches to minimize such damage. **Animal Reproduction Science**, 136(3), 121–135, 2012.

VARNER, D.D.; GIBB, Z.; AITKEN, R.J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal*.v.47(1), p.:16-24, 2015. doi: 10.1111/evj.12308. Epub 2014 Aug 18. PMID: 24943233.

VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, p. 907–917, 1997.

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethylformamide. **Theriogenology**, v.58: p.249-251, 2002. doi: 10.1016/S0093-691X(02)00854-3

VISCONTI, P. E.; BAILEY, J. L.; MOORE, G. D.; PAN, D.; OLDS-CLARKE, P.; & KOPF, G. S. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development**, 121(4), 1129-1137, 1995.

VITA, B.; MONTEIRO, G.A., C.M. MELO, C.M., MAZIERO, R.R.;1, M.T. CARMO, M.T., 1, M.A. ALVARENGA, M.A., P.A. DUTRA, P.A., SANCLER-SILVA, Y.F.R., F.O. PAPA, F.O.. Influência de diferentes sistemas e curvas de congelamento na congelabilidade e fertilidade do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71, n.3, p.770-776, 2019. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10526>

XU, S. Structures of senb and sena enzymes from *Variovorax paradoxus* provide insights into carbon–selenium bond formation in selenoneine biosynthesis. **Heliyon**, 10(12), e32888. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32888>, 2024

YANAGIMACHI, R. (2011). Problems of sperm fertility: A reproductive biologist's view. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, 57(1–2), 102–114. <https://doi.org/10.3109/19396368.2010.507860>

WARMUTH V, ERIKSSON A, BOWER MA, CAÑON J, COTHRAN G, DISTL O, (2011) European Domestic Horses Originated in Two Holocene Refugia. **PLoS ONE** 6(3): e18194. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018194>

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm membranes. In: Clarke A, Morris GJ (Ed.). *Effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press, 1981. p.189-218.

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

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-6, p. 481-92, 2000. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00099-3.

WATHES, D.C.; ABAYASEKARA, D.R.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v.77, p. 190-201, 2007. doi: 10.1095/biolreprod.107.060558.

WONG, B., CHAN, J., CAZENAVE-GASSIOT, A., POH, R., FOO, J., GALAM, D; SILVER, D. Mfsd2a is a transporter for the essential ω -3 fatty acid docosahexaenoic acid (dha) in eye and is important for photoreceptor cell development. **Journal of Biological Chemistry**, 291(20), 10501-10514, 2016. <https://doi.org/10.1074/jbc.m116.721340>

8. APÊNDICE

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE

Ovos de galinha frescos adquiridos de criatório particular foram higienizados em solução de detergente neutro e, em seguida, separadas as gemas do albúmen. As gemas foram delicadamente secas em papel semi Kraft para remoção total da chalaza e dos resíduos de albúmen aderidos na membrana vitelínica. A membrana foi rompida com o auxílio de uma seringa plástica estéril de 10 ml, e aspirou-se imediatamente seu conteúdo depositando em um béquer.

Para obtenção do plasma as gemas foram diluídas na proporção de 1:2 em solução salina (NaCl; 0,17 M) e homogeneizadas a 4-5 °C por 1 hora em agitador magnético. Após isso, a solução foi centrifugada a 11.408xG por 75 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi mensurado, transferido para um béquer e ajustado o pH para 8,7. Após ajustar o pH, foi adicionado lentamente o sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) em pó para atingir concentração final de 40%. A solução permaneceu em constante agitação por cerca de 40 minutos na temperatura de 4 °C.

A solução foi mantida em agitação e refrigeração a 4 °C por mais 1 hora e posteriormente centrifugada a 11.408xG por 75 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi envasado em membrana de diálise Spectra (Molecular porous membrane tubing; MNCO: 12-14,000, diâmetro 29mm), e mantido submerso em água deionizada refrigerada a 5°C por 24 horas. As trocas de água deionizada refrigerada a 5°C para o processo de diálise foram realizadas a cada 3 horas; após a diálise, o conteúdo foi centrifugado a 11.408xG por 75 min a 4 °C. A porção flutuante contida no tubo de centrífuga (Nalgene™), que corresponde a fração de LDL, foi retirado delicadamente. A inclusão da LDL aos diluidores seminais foi realizada imediatamente após a extração.

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE UTILIZANDO CENTRIFUGA REFRIGERADA

Ovos de galinha frescos adquiridos de criatório particular foram higienizados em solução de detergente neutro e, em seguida, separadas as gemas do albúmen. As gemas foram delicadamente secas em papel semi Kraft para remoção total da chalaza e dos resíduos de albúmen aderidos na membrana vitelínica. A membrana foi rompida com o auxílio de uma seringa plástica estéril de 10 ml, e aspirou-se imediatamente seu conteúdo depositando em um béquer.

Para obtenção do plasma as gemas foram diluídas na proporção de 1:2 em solução salina (NaCl; 0,17 M) e homogeneizadas a 4-5 °C por 1 hora em agitador magnético. Após isso, a solução foi centrifugada a 33.000xG por 1 hora e 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente. Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi mensurado, transferido para um béquer e ajustado o pH para 8,7. Após ajustar o pH, foi adicionado 40% de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), lentamente aos sobrenadantes obtidos, na qual permaneceu em constante agitação por cerca de 40 minutos e a temperatura de 4 °C.

Após isso, a solução foi mantida em agitação e refrigeração a 4 °C por mais 1 hora e posteriormente centrifugada a 33.000xG por 1 hora e 30 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi envasado em membrana alternativa de diálise (de celofane, usada em embutidos cárneos) em água deionizada por 24 horas. As trocas de água da diálise foram feitas a cada 3 horas; toda água utilizada foi previamente refrigerada a 4-5 °C. Após o período de diálise, o conteúdo foi centrifugado a 33.000xG por 1 hora e 30 min a 4 °C. A porção flutuante contida no tubo de centrífuga, que corresponde a LDL, foi retirado delicadamente. O armazenamento das LDLs foi feito em tubos Falcon de 50 mL e mantidas a -20 °C até sua utilização.