

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ESTRESSE CONTROLADO INDUZIDO POR PRESSÃO NEGATIVA NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**FLÁVIO ARCI ARAÚJO
URUGUAIANA, RS, BRASIL**

2022

FLÁVIO ARCI ARAÚJO

**ESTRESSE CONTROLADO INDUZIDO POR PRESSÃO NEGATIVA
NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação *Strictu sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Fabricio Desconsi Mozzaquatro

Co-orientador: Prof. Dra. Janislene Trentin

URUGUAIANA

2022

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

A663e Araujo, Flávio Arci

Estresse controlado induzido por pressão negativa na
criopreservação de sêmen equino / Flávio Arci Araujo.
45 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2022.

"Orientação: Fabricio Desconsi Mozzaquatro".

1. CASA. 2. Congelamento de sêmen. 3. Garanhão. 4. ROS. 5.
Potencial oxidante total. I. Título.

FLÁVIO ARCI ARAÚJO

**ESTRESSE CONTROLADO INDUZIDO POR PRESSÃO NEGATIVA NA CRIOPRESERVAÇÃO
DE SÊMEN EQUINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Dissertação defendida e aprovada em: 03 de agosto de 2022.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabrício Desconsi
Mozzaquatro Orientador
(UNIPAMPA)

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira
(UnB)

Prof. Dr. Henrique Boll de Araujo
Bastos(UFRGS)



Assinado eletronicamente por **FABRICIO DESCONSI MOZZAQUATRO, PROFESSOR DO MAGISTERIOSUPERIOR**, em 04/08/2022, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais

aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Rodrigo Arruda de Oliveira, Usuário Externo**, em 04/08/2022, às 17:40, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



Assinado eletronicamente por **Henrique Boll de Araujo Bastos, Usuário Externo**, em 04/08/2022, às 21:52, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unipampa.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0886322** eo código CRC **5C7FFAE3**.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Fabricio Desconsi Mozzaquatro, pelas orientações, pelos valiosos ensinamentos pessoais e profissionais, e todas as oportunidades que me foram concebidas.

As professoras, Dra. Francielli Cibin e Dra. Janislene Trentin pelas contribuições na projeção e/ou desenvolvimento deste trabalho.

A Unipampa, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e aos colegas do laboratório LPE, a positividade e convivência amistosa, tornaram o caminho mais leve e fácil de ser percorrido.

Aos meus pais, Cláudio e Marcia Araújo por indicarem o seguro e correto caminho do estudo; e por protegerem meu bem mais valioso na minha ausência, minha filha Maria Luiza.

A minha companheira, Liana Sarturi, pelo apoio, incentivo e não deixar eu desistir no caminho, bem como a sua família que me deram tanto apoio durante este período.

A família Martins Bastos, por abrirem a sua propriedade, nos fornecendo animais e equipe para o desenvolvimento deste projeto, bem como ao Médico Veterinário Marcelo Napoleão, chefe da sua equipe.

A BOTUPHARMA®, pelo aporte de suprimentos para a execução do trabalho.

Muito obrigado.

“...como um rio que viaja pela floresta, a vida na selva é uma odisséia. Porque a força da alcateia é o lobo, e a força do lobo é a alcateia.”

- Mogli - O Menino Lobo.

RESUMO

O Brasil é um país vasto, e altamente produtivo, apresentando um número expressivo e crescente de animais de produção. O agronegócio do cavalo acompanha esse crescimento impulsionado em grande parte pelo uso de animais em atividades de esporte, lazer e trabalho. Este crescimento deve-se, na maioria das vezes, por melhorias nas técnicas de produção e reprodução. Neste sentido, as biotecnologias da reprodução são importantes ferramentas que auxiliam os criadores no melhoramento genético dos animais. A inseminação artificial vem ganhando cada vez mais espaço no segmento como alternativa, para facilitar a troca de material genético (sêmen) entre propriedades, otimizando e preservando a vida reprodutiva dos ganhões. Possibilita ainda com que animais que apresentem problemas reprodutivos adquiridos possam ser multiplicados. Uma das técnicas em ascensão na reprodução equina é a criopreservação de sêmen. Embora os protocolos de criopreservação tenham avançado muito nos últimos anos e apresentem inúmeras vantagens (conservação de material genético, possibilidade de armazenamento, facilidade no transporte) ainda necessitam de revisão e aprimoramento devido à grande variabilidade nos resultados. Assim, vários estudos têm sido realizados na tentativa de melhorar a qualidade do sêmen criopreservado aprimorando as técnicas de congelamento. Uma das causas citadas na literatura relacionados à diminuição da fertilidade do sêmen equino são os danos provocados pelo acúmulo de espécies reativas ao oxigênio (ERO's). Neste sentido, alguns autores têm proposto que a submissão de gametas a algum tipo de estresse controlado pode melhorar a criotolerância das células. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar se o estresse controlado fornecido por diferentes intensidades de pressão negativa (200, 500 e 800 mbar) no sêmen equino melhoram os parâmetros reprodutivos seminais pós descongelamento. Foram utilizados 13 ejaculados oriundo de 4 ganhões. Cada ejaculado foi dividido igualmente em 4 grupos (controle, P200, P500 e P800). Os tratamentos foram submetidos às diferentes pressões por 15 minutos. Após foi realizado o protocolo de congelamento para os 4 grupos. As amostras foram analisadas quanto a sua cinética espermática através do CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). O estresse oxidativo foi analisado através da quantificação de ERO's e potencial antioxidante total. A funcionalidade de membrana foi realizada através do teste hiposmótico. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, sendo considerado significativo quando o valor de $p < 0,05$. No teste hiposmótico, o controle e o grupo P500 exibem similaridade no resultado

($17,6 \pm 4,1$ e $18,0 \pm 4,1$ respectivamente) apresentando diferença significativa do grupo P200 ($11,5 \pm 1,8$) e maior diferença do grupo P800 ($7,6 \pm 2,0$). Com relação à cinética espermática, não houve diferença estatística significativa entre os grupos, se mantendo similar ao controle nos parâmetros motilidade total, motilidade circular, imóveis, motilidade lenta, motilidade local, motilidade progressiva. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos, quanto à produção de espécies reativas, tampouco, quanto ao potencial antioxidante total. Podemos observar que houve influência da utilização de pressão negativa como forma de estresse controlado, frente à funcionalidade de membrana das células espermáticas de equinos, contudo, se faz necessária a realização de mais estudos para se obter melhor entendimento sobre o tema.

Palavras-chave: CASA, congelamento, garanhão, espermatozoide, ROS, potencial antioxidante total.

ABSTRACT

Brazil is a vast and highly productive country, with an expressive and growing number of production animals. Horse agribusiness has followed this growth, driven largely by the use of animals in sport, leisure and work activities. This growth is due, in most cases, to improvements in production and reproduction techniques. In this sense, reproduction biotechnologies are important tools that help breeders in the genetic improvement of animals. Artificial insemination has been gaining more and more space in the segment as an alternative to facilitate the exchange of genetic material (semen) between properties, optimizing and preserving the reproductive life of stallions. It also allows animals with acquired reproductive problems to be multiplied. One of the emerging techniques in equine reproduction is semen cryopreservation. Although cryopreservation protocols have advanced a lot in recent years and have numerous advantages (conservation of genetic material, possibility of storage, ease of transport) they still need to be revised and improved due to the great variability in results. Thus, several studies have been carried out in an attempt to improve the quality of cryopreserved semen by improving freezing techniques. One of the causes cited in the literature related to decreased fertility of equine semen is the damage caused by the accumulation of reactive oxygen species (ROS). In this sense, some authors have proposed that the submission of gametes to some type of controlled stress can improve the cryotolerance of cells. Thus, the objective of this work was to verify whether the controlled stress provided by different intensities of negative pressure (200, 500 and 800 mbar) in equine semen improves post-thawing seminal reproductive parameters. Thirteen ejaculates from 4 stallions were used. Each ejaculate was divided equally into 4 groups (control, P200, P500 and P800). The treatments were submitted to different pressures for 15 minutes. After that, the freezing protocol was performed for the 4 groups. The samples were analyzed for their sperm kinetics using CASA (Computer Assisted Sperm Analysis). Oxidative stress was analyzed by quantifying ROS and total antioxidant potential. Membrane functionality was performed using the hypoosmotic test. Results were expressed as mean and standard deviation, being considered significant when $p < 0.05$. In the hypoosmotic test, the control and the P500 group showed similar results (17.6 ± 4.1 and 18.0 ± 4.1 respectively), showing a significant difference from the P200 group (11.5 ± 1.8) and greater difference from the P800 group (7.6 ± 2.0). Regarding sperm kinetics, there was no statistically significant difference between the groups,

remaining similar to the control in the parameters total motility , circular motility , immobile , slow motility , local motility , progressive motility . There were no statistical differences between the groups regarding the production of reactive species, nor regarding the total antioxidant potential. We can observe that there was an influence of the use of negative pressure as a form of controlled stress, against the membrane functionality of equine sperm cells, however, it is necessary to carry out more studies to obtain a better understanding on the subject.

Keywords: CASA, freezing, stallion, sperm, ROS, total antioxidant potential.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Gráfico da expressão do Potencial antioxidante total (FRAP) pós descongelamento de espermatozoides equinos submetidos à um estresse controlado com diferentes pressões negativas (P200, P500 e P800) pré-criopreservação. Os dados estão expressos como unidades equivalentes a μg de ácido ascórbico (média $\mu\text{g} \pm \text{SD}$) $p > 0,05$ 31
- Figura 2. Gráfico da expressão do Potencial antioxidante total (FRAP) pós descongelamento de espermatozoides equinos submetidos à um estresse controlado com diferentes pressões negativas (P200, P500 e P800) pré-criopreservação. Os dados estão expressos como unidades equivalentes a μg de ácido ascórbico (média $\mu\text{g} \pm \text{SD}$) quando levado em consideração o fator individual de cada garanhão.....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de cinética espermática de espermatozoides equinos obtidos pela análise computadorizada (CASA) nos diferentes grupos (Controle – sem pressão; P200 – exposição a pressão negativa de 200 mbar), P500 (exposição a pressão negativa de 500 mbar) e P800 (exposição a pressão negativa de 800 mbar) pós descongelamento. Os valores estão expressos em (média (%) \pm desvio padrão).....30

Tabela 2. Resultado da integridade de membrana de espermatozoides equinos obtidos através do teste hiposmótico nos diferentes grupos Controle (sem pressão) P200 (exposição a pressão negativa de 200 mbar), P500 (exposição a pressão negativa de 500 mbar) e P800 (exposição a pressão negativa de 800 mbar) pós descongelamento. Os valores estão expressos em (média (%) \pm desvio padrão).....31

Tabela 3. Efeito da submissão de estresse controlado pré-congelamento com diferentes pressões negativas (P200, P500 e P800) na produção de espécies reativas ao oxigênio em espermatozoides equino no pós-descongelamento imediato. Os dados estão expressos como unidades de fluorescência (média UF \pm SD)31

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP - Trifosfato de Adenosina

Ca²⁺ - Íon Cálcio

CAT - Catalase

CASA - Computer Assisted Semen Analysis

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio Fe²⁺ - Íon Ferroso

FeTPPS - 5,10,15,20 - Tetraquis (4-sulfonatofenil) Porfirinato Ferro (III)

FRAP - Poder antioxidante redutor férrico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LPO - Lipoperoxidação Lipídica

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NO - Óxido nítrico

NADPH - Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina

O₂⁻ - Ânion Superóxido OH - Radical Hidroxil

PH - Pressão hidrostática positiva

PM - Motilidade progressiva

PPM - Pesquisa pecuária municipal

SPTZ - espermatozoides

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	13
2.REVISÃO DE LITERATURA	15
3 OBJETIVO.....	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	21
RESUMO	21
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
RESULTADOS	28
DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
5 CONCLUSÃO.....	35
6 PERSPECTIVAS	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil apresenta o quarto maior rebanho equino do mundo com aproximadamente 6 milhões de animais (IBGE, 2021), movimentando mais de 16 bilhões de reais. O setor ainda é responsável por aproximadamente 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos totalizando 3 milhões de postos de trabalho (MAPA, 2016). Segundo Pesquisa da Pecuária Municipal (PPM) 2020, realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o rebanho equino do Brasil cresceu aproximadamente 2% em 2020, comparado ao ano anterior. Cabe destacar que a equideocultura brasileira também foi bastante influenciada pelos impactos causados pela pandemia de Covid-19 em 2020, devido às restrições ou cancelamentos na promoção de provas, exposições e leilões, e até mesmo aumento no preço dos insumos agropecuários refletindo diretamente no custo da criação. Mesmo diante desse cenário, o real crescimento do efetivo de equinos apresentado pela PPM nos mostra que, de certa forma, o impacto foi absorvido, sem que houvesse prejuízo significativo para o setor equestre. O estado do Rio Grande do Sul é detentor do 3º maior rebanho equino do país. Pode se dizer que a reprodução é a base de um sistema de produção consistente e, para que isso ocorra, a implantação de biotecnologias reprodutivas podem e devem ser utilizadas para acelerar a seleção de genéticas superiores. A intensificação dos sistemas de criação levou a necessidade da aplicação de novas técnicas que garantam um maior e melhor aproveitamento do potencial produtivo, reprodutivo e genético, de diversas espécies (BRANDÃO, 2008).

A utilização de biotecnologias ligadas à reprodução na espécie equina tem aumentado gradativamente ao longo dos anos. Dentre as principais tecnologias destacamos a inseminação artificial com sêmen fresco, resfriado e congelado. Com a abertura das associações de raças para utilização de diferentes biotecnologias da reprodução, a técnica de criopreservação de sêmen vem se destacando como um mercado promissor. Apesar de ter inúmeras vantagens (facilidade no transporte, possibilidade de armazenamento e conservação de material genético) ainda é objeto de inúmeros estudos devido à grande susceptibilidade do sêmen a alterações patológicas, danos crioscópicos e conseqüentemente variabilidade nos resultados. Durante o processo de congelamento e descongelamento do sêmen equino vários problemas podem ocorrer levando a uma perda de até 50% de viabilidade dos espermatozoides. As principais alterações observadas estão relacionadas a estabilidade e integridade da membrana, estresse oxidativo e dano de estrutura nuclear (WATSON, 2000). Segundo Schober et al.

(2007) o processo de congelamento é responsável também por disfunções mitocondriais, afetando assim a utilização da energia produzida pelas próprias mitocôndrias, impedindo com que a célula espermática execute suas funções fisiológicas. Estas alterações, segundo os autores, contribuem para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's). Ball et al. (2000), verificaram que o acúmulo de ERO's dentro do espermatozoide estava relacionado com os efeitos deletérios do processo de criopreservação, diminuindo a viabilidade dos espermatozoides. As espécies reativas de oxigênio, quando em pequenas concentrações atuam ativamente na fisiologia dos espermatozoides (KANKOFER et al., 2005), contudo, maiores concentrações, desencadeiam danos à célula principalmente à membrana plasmática levando a queda de sua capacidade fecundante (HECKENBICHLER et al., 2011). O desequilíbrio na produção e degradação de ERO's leva a uma desregulação da sinalização redox e cria uma condição descrita como estresse oxidativo. Estes efeitos negativos são mais visíveis quando o sêmen é criopreservado (BALL et al., 2000).

Há alguns anos, trabalhos vêm sendo desenvolvidos visando entender melhor os mecanismos fisiológicos envolvendo o estresse oxidativo celular. Alguns pesquisadores observaram que determinados estresses celulares controlados podem propiciar um ambiente favorável de proteção celular, tanto em gametas quanto embriões. Estudos mostram que células submetidas a mecanismos de estresse controlado podem apresentar melhora na criotolerância. Células eucarióticas submetidas à pressão de 0,001 mbar produzem uma resposta similar às proteínas heat shock, sem afetar a viabilidade celular (FREY et al., 2008).

Estresse oxidativo sub letal controlado tem sido aplicado também na criopreservação de sêmen de javalis mostrando melhora na criotolerância e viabilidade espermática (PRIBENSZKY et al., 2011). Estudos semelhantes mostraram efeitos positivos do estresse moderado na melhora da função espermática em touros, reduzindo a peroxidação lipídica e aumentando a sua motilidade (SHARAFI et al., 2015). Em um estudo, Hezavehei et al. (2019) observaram que a indução de estresse controlado com óxido nitroso (NO) antes da criopreservação pode proteger o espermatozoide humano contra lesões criogênicas.

Seguindo esta mesma hipótese, que o estresse controlado poderia fornecer proteção adicional a célula, Mezzalira et al. (2010) utilizaram a pressão negativa como meio de fornecimento de estresse sub-letal controlado. Os pesquisadores demonstraram efeitos benéficos na criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. Casali et al. (2014) utilizaram diferentes pressões negativa antes da criopreservação de sêmen ovino e observaram melhora nas taxas de viabilidade espermática e fecundação in vitro heteróloga quando os espermatozoide foram submetidos a pressão de 500mbar

Até o presente momento, não temos relatos da utilização do estresse controlado em protocolos de criopreservação de espermatozoides equinos. Desta forma este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito/impacto de diferentes pressões negativas na expressão de ERO's e viabilidade dos espermatozoides equinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sêmen

O sêmen é um conjunto de secreções provenientes do aparelho genital masculino, liberadas no momento da ejaculação, caracterizando-se pela presença dos espermatozoides (MIES FILHO, 1987), sendo composto por uma população heterogênea de espermatozoides viáveis e não viáveis suspensos nas secreções de várias glândulas sexuais acessórias (LOOMIS, 2006). Os espermatozoides são células altamente diferenciadas e especializadas em armazenamento e transporte de material genético (AURICH, 2005). A célula espermática consiste em áreas específicas: o acrossoma, núcleo, segmento equatorial, basal, a peça intermediária e cauda (LADHA, 1998). A principal função do espermatozoide está relacionada ao processo de fertilização do oócito. Alguns fatores como integridade de membrana, motilidade progressiva e produção de energia podem influenciar neste processo.

Adicionalmente ao trato reprodutivo masculino, encontramos as glândulas sexuais acessórias que liberam suas secreções misturando-se aos espermatozoides e dando volume ao ejaculado. As glicoproteínas produzidas no epidídimo somada a secreção do plasma seminal oriundo das vesículas seminais são responsáveis por manter a integridade da membrana espermática durante sua passagem pelo trato reprodutivo feminino (AMANN & GRAHAM, 1993; ÖPFER-PETERSEN et al., 2005). No processo de capacitação espermática, tais proteínas são alteradas ou removidas, para que ocorra a fecundação, isso altera o fluxo iônico através das membranas, a fim de manifestar receptores da membrana espermática e remover componentes que possam alterar a motilidade flagelar. Também ocorrem alterações nas porções caudal e rostral da cabeça do espermatozoide, antecedendo a reação acrossômica e na peça intermediária. Tal desestabilização ocorre ligando o colesterol da membrana com proteínas da tuba uterina e de origem folicular (AMANN e GRAHAM, 1992; EHRENWALD et al., 1990). Amann & Graham (1993) afirmam que as alterações na estrutura do espermatozoide durante o processo de resfriamento ou criopreservação, diminuem sua

capacidade fecundante *in vivo* devido as alterações de viabilidade da membrana espermática, função mitocondrial, motilidade progressiva e lesões no acrossoma.

2.2 Inseminação artificial

As biotecnologias da reprodução são uma importante ferramenta a serviço da equideocultura mundial, como instrumento direto de seleção genética. Através da inseminação artificial (IA), um reprodutor pode deixar inúmeros descendentes, impulsionando a disseminação de sua carga genética, e por isso a IA talvez seja a biotecnologia da reprodução de maior impacto em equinos quando usada corretamente (COELHO, 2021; CANISSO et al., 2008). Pode se dizer que o transporte de sêmen não seja em si um fato novo (DAVIES-MOREL, 1999). O crescimento na demanda impulsiona o desenvolvimento de técnicas que exploram o potencial produtivo e reprodutivo das espécies domésticas (BRANDÃO, 2008). Aparentemente, o Brasil é um dos países que mais realizam IA em equinos com sêmen resfriado estando atrás somente dos Estados Unidos (PAPA et al., 2005).

O sêmen utilizado para IA em equinos pode ser a fresco (*in natura*); diluído, onde pode ser transportado refrigerado ou não; e congelado. Cada uma destas tecnologias de processamento tem suas vantagens, indicações e limitações (CARVALHO, 1992). Vários trabalhos verificaram a viabilidade do sêmen em diferentes condições de transporte. O transporte do sêmen pode ser realizado em temperatura ambiente (entre 15°C e 20°C) Malmgren, (1998), Brinsko et al. (1999), Nunes et al. (2008) conseguiram manter o sêmen viável por 6h, porém, Varner et al. (1989) verificaram que o armazenamento do sêmen em temperatura ambiente (20°C) por um período de 12h não prejudica a motilidade mantendo a capacidade fecundante do espermatozoide.

Segundo Jasko et al. (1992) e Brinsko (1999) a fertilidade do sêmen refrigerado é mantida por 24-48h, desde que embalado e resfriado em dispositivo adequado.

Embora a utilização de sêmen equino fresco e resfriado já estejam com resultados bem consolidados, a técnica muitas vezes esbarra em questões de logística. Desta forma, a utilização de sêmen criopreservado proporciona diversas vantagens, como armazenamento e utilização, facilidade na comercialização (compra e venda) de material genético superior (BARRETO et al., 2008).

2.3 Criopreservação espermática

Segundo Watson (1979) os primeiros relatos de diminuição da temperatura do sêmen foram realizados por Spallazani em 1776 e demonstraram uma redução reversível da atividade metabólica dos espermatozoides permitindo o armazenamento destas células. Desta forma, a criopreservação espermática é uma importante biotecnologia que pode ser usada no melhoramento genético da espécie, pelo uso de bons reprodutores de forma mais facilitada. Contudo demonstra um ponto negativo. Os índices de fertilidade obtidos com o sêmen congelado de equinos ainda são muito menores quando comparados a bovinos (FÜRST et al., 2005).

No decorrer do processo de congelamento, as células espermáticas passam por uma etapa crítica de temperatura, tanto no momento da formação dos cristais de gelo quanto na liberação do calor latente de fusão, isto desencadeia os maiores danos a nível celular. No momento que se altera o gradiente osmótico, entre os meios intra e extra celular, a curva de congelamento deve ser mais lenta para que ocorra a desidratação da célula e não haja a formação de grandes cristais de gelo no meio intracelular (ALVARENGA et al., 2016). Logo após o período de estabilização, a curva de congelação deve ser rápida (entre -3°C e -10°C) (CHAVEIRO et al., 2006).

A difusão das técnicas de criopreservação, se alia aos esforços empregados para a melhoria do sêmen pós descongelamento, as quais, geralmente se baseiam na utilização de diferentes diluentes ou componentes específicos afim de manter a integridade das células espermáticas, podendo utilizar diversos componentes (açúcares, eletrólitos, tampões, gema de ovo, leite, antioxidantes e etc.) (SAMPER, 2000) a fim de proteger o espermatozoide do estresse oxidativo. Contudo, mudanças nas técnicas de congelamento vêm sendo testadas a fim de minimizar os danos causados durante o procedimento. Desta forma, diversos estudos buscam encontrar alternativas que minimizem o estresse oxidativo celular. Nos últimos anos, alguns autores vem sugerindo que o uso de um estresse subletal leve aplicado na célula possa melhorar a tolerância a eventos adversos futuros, propiciando ambiente favorável de proteção celular (PRIBENSZKY et al., 2010).

2.4 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio

As células espermáticas sofrem constantemente o paradoxo do oxigênio. Estes processos são necessários para a manutenção das funções fisiológicas da célula (BALL et al.,

2001). Vários trabalhos (LAMIRANTE; CAGNON, 1992; GUERRA et al., 2004; AITKEN; DREVET, 2020) sugerem que o espermatozoide precisa produzir pequenas quantidades de espécies reativas ao oxigênio (ERO's) para que ocorra a capacitação espermática sendo essencial para a viabilidade do gameta masculino. Os autores sugerem ainda que a peroxidação lipídica que ocorre na membrana celular possa estar envolvida na viabilidade seminal. Para atingir o potencial fecundante, o espermatozoide depende da metabolização de oxigênio, este processo está ligado a formação de ERO's, através da formação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (FRACZEK & KURPISZ 2005). Em contrapartida, altas taxas de ERO's podem influenciar o sistema intracelular de defesa antioxidante das células espermáticas, deixando-as mais sensíveis ao estresse oxidativo, afetando a integridade do DNA e funções do espermatozoide (MORTE et al., 2008).

As células espermáticas apresentam altos teores de ácidos graxos poli-insaturados fato este que a torna altamente suscetíveis à produção de radicais livres e espécies reativas ao oxigênio (GARCIA et al., 2011).

Dentro do espermatozoide os monossacarídeos são convertidos em ATP (Adenosina trifosfato), e são utilizados para a movimentação dos espermatozoides. Este metabolismo celular resulta na produção de resíduos, tais como o ácido lático e as ERO's (GRAHAM, 2011) que exercem relevante papel no controle da capacitação espermática, reação acrossômica, hiperativação da cauda e ligação espermatozoide-ovócito (MISLEI et al., 2020). A elevada produção de ERO's leva a redução da motilidade, redução da viabilidade do espermatozoide e conseqüentemente, baixa na taxa de fecundação, por afetarem lipídeos, proteínas da membrana, DNA nuclear e mitocondrial. Alguns autores acreditam que tais alterações se devam a possíveis vazamentos de elétrons da cadeia de transporte e ao esgotamento dos níveis de ATP mitocondrial (BALL, 2008; MORAES et al., 2015; AITKEN et al., 2020).

2.5 Estresse controlado

O conceito de utilizar estresse controlado para promover proteção celular não é novo e remonta ao início do século com os estudos de Hide, 1899 apud Pribenszky et al., (2010). A indústria alimentícia incorporou a técnica e a aplicou em larga escala realizando combinações sequenciais de tratamentos leves (pressão hidrostática, resfriamento e/ou aquecimento) como método de preservação de alimentos. No entanto, um artigo publicado em 2002 por Wemekamp-Kamphuis e colaboradores mostrou um efeito inesperado da técnica. Estes

pesquisadores verificaram que tratamentos sequenciais com pressão hidrostática positiva (PH) e frio aumentavam a proliferação de bactérias. Os autores verificaram que a taxa de sobrevivência das bactérias foi 100x maior depois do tratamento com a PH e as bactérias produziram 3x mais fatores de proteção quando comparado ao grupo controle. Como conclusão deste trabalho foi estabelecida que a pressão hidrostática estivesse fornecendo condições de proteção para o desenvolvimento celular. Tais observações acabaram motivando o desenvolvimento de estudos aplicando estresse controlado na área das biotecnologias reprodutivas (oócitos, espermatozoide, embriões e cultivos celulares diversos). Existem diversas maneiras para promover estresse controlado celular (variação osmótica, de temperatura, de pressão). Em tese, a técnica consiste em submeter a célula a um estresse subletal controlado para que a mesma possa criar mecanismos protetores que a ajudem a sobreviver as injúrias (PRIBENSZKY et al., 2006; 2011; MEZZALIRA et al., 2010; VAJTA 2011; SHARAFI et al., 2015; FEYZI et al., 2018)

Dentre as diversas técnicas que podem ser utilizadas, a que ganhou mais destaque foi a da pressão hidrostática positiva. Em um estudo bastante inovador, Pribenszky et al. (2005), aplicaram pressão hidrostática antes do processo de vitrificação embrionária. Os autores verificaram que a velocidade de desenvolvimento in vitro, sobrevivência e as taxas de eclosão de embriões de camundongo foram maiores no grupo tratado quando comparado ao controle. Este mesmo grupo de pesquisadores verificou ainda que mudanças de pressão quando aplicadas em células espermáticas de suínos melhoraram a motilidade e a qualidade do sêmen pós descongelamento (PRIBENSZKY, et al., 2006; 2011). Pribenszky; Vajta (2011), em uma revisão aprofundada do tema concluíram que a submissão de gametas e embriões, a um nível de estresse subletal utilizando a pressão hidrostática oferece uma solução para melhoria da qualidade geral das células, ou seja, cria condições para que se tenha maior tolerância ao estresse criogênico melhorando a capacidade de fertilização e competência de desenvolvimento. Estes mesmos autores ainda citam que o aumento da criotolerância das células deve-se a resposta das mesmas ao estresse controlado induzido, que provoca modificações na expressão gênica, modificações do mRNA após transcrição, modificações de proteínas por fatores pós transicionais, indução e interação entre diversas proteínas, inclusive do DNA (PRIBENSZKY; VAJTA, 2011).

Outros estudos apontam o efeito benéfico do estresse subletal induzido pela exposição ao óxido nítrico (NO) por 60min antes da criopreservação. SHARAFI et al., (2015) utilizaram NO em espermatozoides humanos e FEYZI et al., (2018) em espermatozoides de galinha. Ambos estudos mostraram melhora na qualidade espermática pós descongelamento.

2.6 Pressão Negativa

Nesta mesma temática, a pressão negativa tem sido utilizada como promotor de estresse subletal controlado para melhorar a criotolerância de embriões (MEZZALIRA et al., 2010) e oócitos (ALBINO et al., 2012) bovinos, melhorar as taxas de produção de embriões bovinos (PINZON et al., 2012) e na criopreservação de espermatozoides ovinos (CASALI et al., 2014). Liposki e colaboradores (2018) demonstraram o efeito positivo da submissão à pressão negativa de 200 mbar, antes do congelamento de células fetais bovinas. Casali et al., (2014), aplicaram diferentes pressões negativas (200, 500 e 800 mBar durante três minutos) em células espermáticas pré-congelamento, onde verificaram que a pressão negativa de 500 mBar foi a mais adequada, pois manteve a motilidade progressiva por até 3h após o descongelamento e possibilitou melhores taxas de fertilização *in vitro* heteróloga com oócitos bovinos. Embora haja reconhecimento dos efeitos benéficos do estresse controlado na criotolerância celular ainda não temos informação da sua utilização com sêmen equino.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito/impacto de diferentes pressões negativas na viabilidade dos espermatozoides equinos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a viabilidade espermática do sêmen equino após a submissão ao protocolo de estresse controlado com pressão negativa de 200, 500 e 800 mBar;

Verificar se o protocolo de estresse controlado com diferentes pressões negativas interfere no estresse oxidativo e na produção de ERO pela célula espermática;

Verificar se o protocolo de estresse controlado com diferentes pressões negativas melhora a criotolerância de espermatozoides equinos;

4 ARTIGO CIENTÍFICO

RESUMO

Neste estudo avaliou-se a influência da exposição do sêmen equino a pressão negativa pré congelamento, e seus efeitos no pós descongelamento. As variáveis analisadas foram cinética espermática, funcionalidade de membrana, produção de ERO's e capacidade antioxidante total. Foram utilizados 13 ejaculados oriundos de 4 garanhões. Cada ejaculado foi dividido em 4 grupos (controle, P200 mbar, P500 mbar e P800 mbar) conforme a intensidade da pressão negativa imposta. Após a exposição à pressão negativa, o sêmen foi envazado em palhetas de 0,5ml, na concentração de 100×10^6 spz/ml, sendo congelado de forma automatizada e criopreservado em nitrogênio líquido até a data da avaliação. As variáveis analisadas pós descongelamento foram cinética espermática através do programa CASA, potencial oxidante total (FRAP), formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO's) e funcionalidade de membrana plasmática (teste hiposmótico). Ao analisar a funcionalidade de membrana através do teste hiposmótico verificou-se que a pressão de 500mbar foi superior as demais pressões sendo igual ao controle. Já para as variáveis de cinética espermática, produção de ERO's e capacidade antioxidante total não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$). Desta forma, conclui-se que a utilização pré-congelamento da pressão negativa 200, 500 ou 800 mbar durante 15 minutos, não interfere na produção de ERO's, potencial antioxidante total e na cinética dos espermatozoides equinos. Os resultados apontam que a P500 não traz dano a célula espermática, igualando seus resultados ao grupo controle. Contudo mais estudos devem ser realizados para melhor elucidar estes achados.

Palavras-chave: estresse controlado, CASA, congelamento, equino, espermatozoide.

ABSTRACT

In this study, the influence of equine semen exposure to pre-freezing negative pressure and its effects on post-thawing were evaluated. The variables analyzed were sperm kinetics, membrane functionality, ROS production and total antioxidant capacity. Thirteen ejaculates from 4 stallions were used. Each ejaculate was divided into 4 groups (control, P200 mbar, P500 mbar and P800 mbar) according to the intensity of the negative pressure imposed. After exposure to negative pressure, the semen was poured into 0.5ml straws, at a concentration of 100×10^6 sperm/ml, being frozen automatically and cryopreserved in liquid nitrogen until the date of evaluation. The variables analyzed after thawing were sperm kinetics using the CASA program, total oxidant potential (FRAP), formation of reactive oxygen species (ROS) and plasma membrane functionality (hyposmotic test). When analyzing the membrane functionality through the hyposmotic test, it was verified that the pressure of 500mbar was superior to the other pressures, being equal to the control. As for the variables of sperm kinetics, ROS production and total antioxidant capacity, no statistical difference was observed ($p > 0.05$). In this way, it is concluded that the pre-freezing use of negative pressure 200, 500 or 800 mbar for 15 minutes does not interfere with the production of ROS, total antioxidant potential and kinetics of equine sperm. The results indicate that P500 does not damage the sperm cell, matching its results to the control group. However, further studies should be performed to better elucidate these findings.

Keywords: CASA, freezing, stallion, sperm, ROS, total antioxidant potential.

INTRODUÇÃO

A criopreservação é amplamente empregada na reprodução animal, sendo uma estratégia importante na conservação de gametas e embriões. O congelamento de sêmen tem sido utilizado em diversas espécies estando bem estabelecido em bovinos. Na espécie equina, os protocolos de criopreservação avançaram muito nos últimos anos, contudo a inseminação artificial utilizando sêmen congelado ainda resulta em menores taxas de fertilidade quando comparadas aos resultados obtidos com sêmen a fresco ou resfriado (ALVARENGA et al., 2016). O processo de criopreservação e descongelamento reduz a integridade acrossomal, viabilidade e motilidade de espermatozoides de garanhões (BEDFORD et al., 2000; NEILD et al., 2003). Isto se deve a manipulação excessiva do sêmen durante a técnica de congelamento (centrifugação para remoção do plasma seminal), ao procedimento de congelamento (onde pode ocorrer a formação de grandes cristais de gelo) e no descongelamento (modificação na osmolaridade dos espermatozoides) o que levam a célula a um estresse osmótico extremo. Estes fatores causam danos a membrana celular (MORRIS et al., 2007), alterações no DNA (KLEWITZ et al., 2008) e podem levar a célula a uma produção desequilibrada de ERO's que causam mudanças prematuras na capacitação espermática (BURNAUGH et al., 2010). Baixos níveis de ERO's são necessários para a funcionalidade celular, contudo, a produção excessiva destes radicais livres podem desencadear processos oxidativos que afetam diretamente a qualidade e funcionalidade seminal. A célula espermática possui uma defesa antioxidante frágil, devido à escassez de citoplasma, desta forma é muito susceptível ao estresse oxidativo, pois as ERO's afetam os lipídeos e proteínas da membrana e também o DNA mitocondrial e celular, o que leva a diminuição nas taxas de fecundação por interferência na motilidade e viabilidade espermática (MORAES et al., 2015).

Nos últimos anos, alguns trabalhos vêm demonstrando os benefícios da aplicação de estresse controlado subletal na criopreservação de oócitos (DU et al., 2008), embriões (BOCK et al., 2010) e sêmen (PRIBENSZKY et al., 2011). Estudos relataram que o uso de estresse subletal controlado utilizando alta pressão hidrostática (HHP) (HORVATH et al., 2016), pressão osmótica (COLE and MEYERS, 2011), etanol (DODARAN et al., 2015) e/ou agentes oxidantes (SHARAFI et al., 2015) antes da criopreservação podem aumentar a resistência espermática contra criodanos. A pressão negativa também tem sido utilizada como promotor de estresse subletal controlado melhorando a criotolerância de embriões (MEZZALIRA et al., 2010; PINZON et al., 2012) e oócitos bovinos (ALBINO et al., 2012), espermatozoides

ovinos (CASALI et al., 2014) e em células fetais bovinas (LIPOSKI et al., 2018). Recentemente, óxido nítrico (NO) foi utilizado como agente indutor de estresse subletal em espermatozoides bovinos melhorando as taxas de viabilidade espermática pós descongelamento (HEZAVEHEI et al., 2019). Embora os mecanismos envolvidos que levam a melhora na criotolerância dos espermatozoide ainda não estejam bem elucidados, Pribenzski et al. (2010) e Gholami et al. (2018), sugerem que uma resposta proteica induzida pelo estresse subletal possa ser responsável pela melhora da criosobrevivência espermática. Huang et al. (2009) relataram aumento na motilidade pós-descongelamento quando os espermatozoides foram tratados com pressão hidrostática subletal. Estes autores verificaram ainda alterações no perfil proteico do espermatozoide tratado em relação ao controle. Outros estudos em animais ainda mostraram os efeitos positivos do estresse na função espermática reduzindo a peroxidação lipídica e aumentando a motilidade (DODARAN et al., 2015; SHARAFI et al., 2015).

A hipótese deste trabalho foi que a aplicação de estresse controlado no sêmen equino poderia melhorar a criotolerância modificando a produção de ERO's. Assim este estudo teve como objetivo avaliar o potencial efeito protetor do estresse controlado fornecido por diferentes pressões negativas na criopreservação do sêmen equino.

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Pampa (número de protocolo: 012/2021)

Garanhões

Foram utilizados 3 garanhões da raça Crioula e 1 Puro Sangue de Corrida (PSC) com idade média de 12,25 (\pm 5,49) anos. Todos os animais apresentavam saúde reprodutiva. Os animais foram mantidos em piquetes com pastagem de campo nativo, água e sal mineral *ad libitum*, sendo suplementados com 1,5% do seu peso vivo (PV) de concentrado. Antes do início do experimento todos os garanhões foram coletados (3 a 4 vezes) em dias alternados para esgotar/renovar as reservas seminais extra gonadais.

Coleta de sêmen

As coletas de sêmen (n=18) foram realizadas com vagina artificial (modelo Botucatu). Os ejaculados foram obtidos entre os meses de março a junho de 2021. Contudo, 5 destas coletas foram descartados (2 por apresentarem presença de urospermia, 1 por ausência de espermatozoides viáveis, 1 por erro de manipulação após a colheita, 1 por não atingir os parâmetros necessários para ser aprovado). Imediatamente após a coleta, o sêmen foi diluído em Botusêmen® na proporção de 1:1 (mesma proporção de sêmen e diluente), e em seguida, as amostras foram transportadas ao laboratório em caixa térmica refrigerada a 15°C, não ultrapassando 30min de transporte, onde foram avaliados levando em consideração os seguintes parâmetros: volume livre da fração gel ≥ 30 ml, motilidade total $\geq 70\%$, concentração $\geq 100 \times 10^6$ spz/ml e sem alterações físicas macroscópicas. Também foram realizadas as técnicas de coloração supra vital e patologia espermática para a aprovação do sêmen para congelamento. As amostras aprovadas em todos os testes seguiram para posterior processamento.

Análise pré-congelamento

Coloração supravital – eosina / nigrosina

Para execução utilizou-se o método descrito em 1951 Swanson e Bearden leitura realizada em microscopia com aumento de 400x, onde 200 células de cada tratamento foram contadas.

Patologia espermática

Para execução utilizou-se o método de Cerovsky (1973), a leitura realizada em microscopia com aumento de 1000 x, com auxílio de óleo de imersão, onde 200 células de cada tratamento foram contadas e seus defeitos classificados quanto às patologias, tal técnica serviu de base para o cálculo do teste hiposmótico.

Pressão Negativa

O ejaculado foi distribuído de forma homogênea em tubos de 15mL conforme grupos experimentais: Controle (sem exposição a pressão negativa), P200 (exposto a pressão negativa de 200 mbar), P500 (exposto a pressão negativa de 500 mbar), P800 (exposto a pressão negativa de 800 mbar). A técnica de exposição a pressão negativa seguiu protocolo descrito por Casali et al. (2014) adaptado, através de uma bomba de vácuo Vix® (¼ hp 60Hz.) acoplada a um câmara de pressão que forneceu uma atmosfera de 200 à 800 mbar de acordo com os tratamentos. A curva de pressão respeitou o seguinte tempo de exposição: subida da curva lenta gradual até chegar na pressão desejada (5 min); manutenção na pressão desejada (5 min); descida da curva até ser retomada a atmosfera ambiente (5 min). Após o período de exposição a pressão negativa o sêmen seguiu o protocolo de congelamento.

Criopreservação do sêmen

Após o período de exposição à pressão negativa, os tubos previamente identificados (Controle, P200, P500 e P800) foram centrifugados em centrífuga de bancada (K-14-4000 KASVI®) a 600x G por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em diluente Botucrio® ajustando a concentração espermática em 100×10^6 sptz/ml. Posteriormente, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml, lacradas com álcool polivinílico e congeladas em máquina automatizada TK 3000 (TK tecnologia em congelação, Ltda., Minas Gerais, Brasil) com curva de resfriamento $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ e congeladas com curva de $-20^\circ\text{C}/\text{min}$ até atingir -60°C e a curva de $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ entre -60°C e -100°C . Em seguida as palhetas de sêmen foram retiradas da máquina e imersas em nitrogênio líquido (-196°C) sendo conservadas em botijões até a data das avaliações.

Analises pós descongelamento

Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)

O CASA (Computer Assisted Sperm Analysis, AndroVision®, Minitube, Tiefenbach, Alemanha) é um sistema de hardware e software utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações precisas, confiáveis e significativas do

movimento individual de cada célula, bem como, de subpopulações de células espermáticas. As variáveis mensuradas foram as seguintes: motilidade total, motilidade circular, motilidade rápida, motilidade lenta, motilidade local, motilidade progressiva e imóveis. Os padrões utilizados para o ajuste do equipamento foram: 30 imagens/segundo com 60 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 80 $\mu\text{m/s}$ e rápidos acima de 80 $\mu\text{m/s}$.

Esta análise foi realizada em parceria com o laboratório de reprodução animal (REPROLAB) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

O potencial antioxidante total (FRAP)

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) é um teste rápido, preciso e capaz de reproduzir em condições adversas que mede a capacidade dos antioxidantes para reduzir o ferro férrico (Fe^{3+}). A baixo pH, o excesso de Fe^{3+} na mistura da reação é reduzido à forma ferrosa, ao qual gera a formação de cor que está diretamente relacionada com a capacidade de redução da amostra. Neste ensaio, os antioxidantes presentes na amostra foram avaliados como redutores do Fe^{3+} a Fe^{2+} , o qual é quelado pela 2,4,6-Tri (2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{2+} -TPTZ com absorção máxima em 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996).

Para a expressão dos resultados de usa a comparação com uma curva de antioxidante conhecido, para tal, se utilizou de ácido ascórbico. Os valores são expressos em unidades equivalentes ao ácido ascórbico (EqAA).

Espécies reativas de oxigênio

Os níveis de espécies reativas foram determinados por um método espectrofluorimétrico, usando 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-D) (LOETCHUTINAT et al., 2005). As amostras foram incubadas em ambiente escuro com 5 μL de DCF- C (1mM). Foi monitorada a oxidação da DCF-D para diclorofluoresceína (DCF) fluorescente pelas espécies reativas. A emissão da intensidade de fluorescência foi realizada em 520 nm (com excitação de 488 nm) 60 minutos após a adição da DCF-D, em Espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301PC. Os resultados foram expressos em UF (unidades de fluorescência).

Funcionalidade da Membrana – Teste Hiposmótico

Para tal, foi utilizada a técnica descrita por Jeyedran e colaboradores (1984), utilizando solução hiposmótica, composta por água destilada (1000ml) citrato de sódio (7,35g) e frutose (13,5g). O sêmen foi adicionado na proporção de 1:10 de solução, incubado em banho-maria durante 1h à 37°C, a leitura realizada em microscopia com aumento de 400X, e contadas um mínimo de 200 células. O resultado foi expresso em percentagem de espermatozoides reativos ao teste.

RESULTADOS

Sistema de análise computadorizada

Os parâmetros de cinética espermática obtidos pelo CASA em avaliação imediata após o procedimento de descongelamento, podem ser observados na tabela 1. Em nenhum dos parâmetros mensurados foi observada diferença estatística entre os grupos controle e as diferentes pressões.

Tabela 1. Parâmetros de cinética de espermatozoides equinos obtidos pela análise computadorizada (CASA) nos diferentes grupos (Controle – sem pressão; P200 – exposição a pressão negativa de 200 mbar), P500 (exposição a pressão negativa de 500 mbar) e P800 (exposição a pressão negativa de 800 mbar) pós descongelamento. Os valores estão expressos em (média (%) \pm desvio padrão). $P > 0,05$

Grupo	Motilidade total	Motilidade circular	Motilidade rápida	Imóveis	Motilidade lenta	Motilidade local	Motilidade progressiva
Controle	45,9 \pm 14,1	1,9 \pm 1,2	6,7 \pm 3,7	54,0 \pm 14,1	20,3 \pm 10,2	16,8 \pm 6,5	28,7 \pm 13,6
P200	43,18 \pm 10,8	2,3 \pm 0,9	5,5 \pm 1,8	56,6 \pm 10,9	17,4 \pm 6,4	17,9 \pm 5,9	23,7 \pm 9,2
P500	45,0 \pm 12,1	2,4 \pm 1,0	6,0 \pm 4,2	54,9 \pm 12,1	16,8 \pm 7,4	18,2 \pm 6,6	26,3 \pm 9,5
P800	41,2 \pm 13,2	1,6 \pm 1,2	4,1 \pm 2,3	58,7 \pm 13,1	15,3 \pm 8,9	19,9 \pm 8,1	20,7 \pm 10,7

Integridade de membrana pelo teste hiposmótico

O percentual de espermatozoide com membrana intacta foram determinados através do teste hiposmótico. Como pode ser observado na tabela 2 o grupo P800 foi o que apresentou menor percentual de células com membrana intacta (7,6 \pm 2,0) quando comparado aos demais grupos. O grupo P500 apresentou o maior percentual de células com membrana intacta (18,0

$\pm 4,1$) sendo estatisticamente igual ao grupo Controle ($17,6 \pm 4,1$; $p > 0,05$).

Ao compararmos os grupos com as diferentes pressões, verificamos que o percentual de células intactas do grupo P500 foi diferente dos demais (P200 [$11,5 \pm 1,8$] e P800 [$7,6 \pm 2,0$]; $p < 0,05$).

Tabela 2. Resultado da integridade de membrana de espermatozoides equinos obtidos através do teste hiposmótico nos diferentes grupos Controle (sem pressão) P200 (exposição a pressão negativa de 200 mbar), P500 (exposição a pressão negativa de 500 mbar) e P800 (exposição a pressão negativa de 800 mbar) pós descongelamento. Os valores estão expressos em (média (%) \pm desvio padrão). ^{a,b} letras diferentes nas linhas correspondem a diferença estatística ($p < 0,05$)

GRUPO	PERCENTUAL DE CELULAS INTACTAS
CONTROLE	17,6\pm4,1^a
P200	11,5\pm1,8^b
P500	18,0\pm4,1^a
P800	7,6\pm2,0^c

Avaliação do estresse oxidativo (ERO'S e FRAP)

O status antioxidante foi avaliado para verificar se a submissão do sêmen equino a um estresse controlado com diferentes pressões negativas interfere na produção de radicais livres. Nenhuma diferença estatística foi observada em relação aos indicadores de estresse oxidativo avaliados. Os resultados de ERO's e FRAP estão demonstrados na tabela 3 e gráfico 1, respectivamente. O gráfico 2, apresenta os resultados da FRAP, levando em consideração a influência individual de cada um dos garanhões.

Tabela 3. Efeito da submissão de estresse controlado pré-congelamento com diferentes pressões negativas (P200, P500 e P800) na produção de espécies reativas ao oxigênio em espermatozoides equino no pós-descongelamento imediato. Os dados estão expressos como unidades de fluorescência (média UF \pm SD) $p > 0,05$.

GRUPO	MÉDIA UF \pm SD
CONTROLE	17,5 \pm3,8
P200	19,4\pm3,9
P500	18,8\pm3,9
P800	19,4\pm4,0

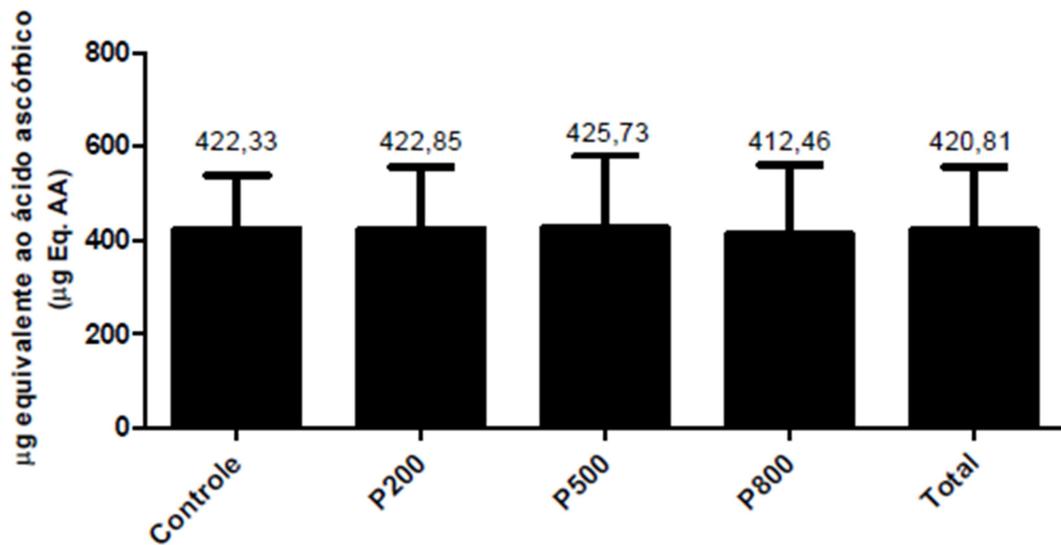


Gráfico 1. Expressão do Potencial antioxidante total (FRAP) pós descongelamento de espermatozoides equinos submetidos à um estresse controlado com diferentes pressões negativas (P200, P500 e P800) pré-criopreservação. Os dados estão expressos como unidades equivalentes a μg de ácido ascórbico (média $\mu\text{g} \pm \text{SD}$) $p > 0,05$

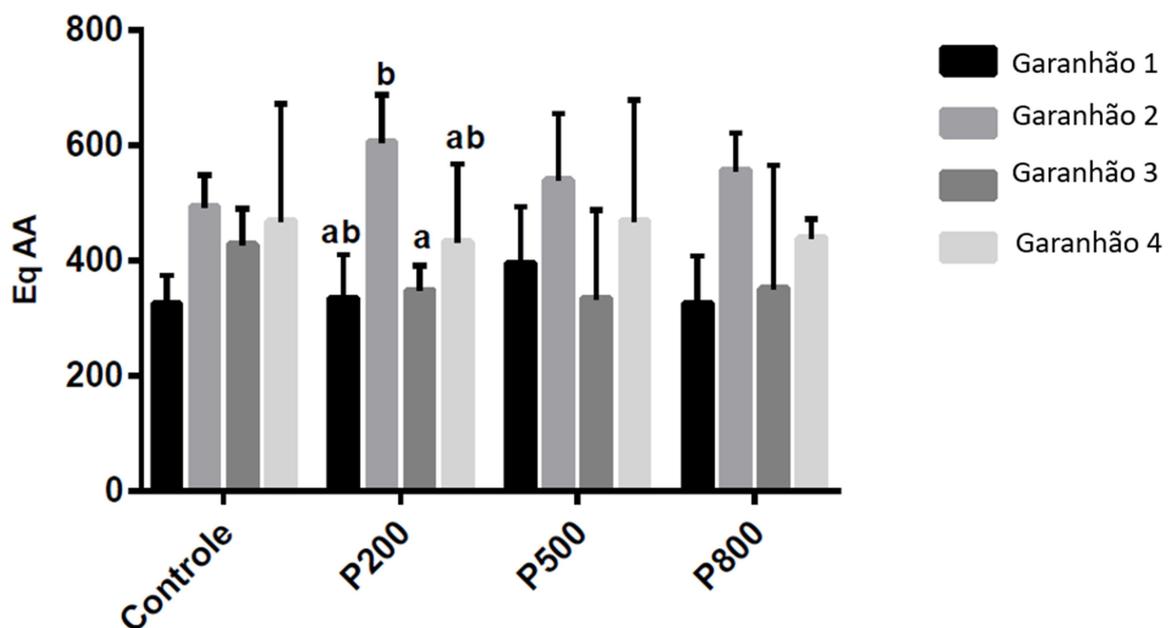


Gráfico 2. Expressão do Potencial antioxidante total (FRAP) pós descongelamento de espermatozoides equinos submetidos à um estresse controlado com diferentes pressões negativas (P200, P500 e P800) pré-criopreservação. Os dados estão expressos como unidades equivalentes a μg de ácido ascórbico (média $\mu\text{g} \pm \text{SD}$), quando levado em consideração o fator individual de cada garanhão. ^{a,b} letras diferentes correspondem a diferença estatística ($p < 0,05$)

DISCUSSÃO

A utilização de estresse subletal controlado vem sendo empregado como uma abordagem alternativa para melhorar a criotolerância de gametas e embriões em diferentes espécies. Várias técnicas de geração do estresse subletal tem sido empregadas (estresse osmótico, pressão hidrostática e pressão negativa) com benefícios na proteção celular. No presente estudo foi utilizado a pressão negativa como forma de obtenção proteção celular. Os resultados obtidos mostraram que a pressão de 500mbar não traz danos a células espermáticas equinas, diferindo das demais pressões, e sendo igual estatisticamente ao grupo controle. Resultados semelhantes também foram obtidos por Casali et al. (2014) que utilizando a pressão negativa de 500mbar verificaram melhora na taxa de fecundação *in vitro* heteróloga com sêmen de carneiro.

Embora o resultado de integridade de membrana tenha mostrado efeito diferencial entre as pressões, onde o grupo p500 demonstrou não ter um efeito negativo para a célula espermática quando comparado ao controle, este fato não foi observado na cinética espermática onde não houve diferença entre o controle e os diferentes tratamentos. Resultado diferentes foram encontrados por Pribenszky et al. (2006) que verificaram melhora na cinética espermática (motilidade progressiva) em espermatozoides suínos e bovinos submetidos a estresse controlado. O que diferiu do presente trabalho para o realizado por Pribenszky et al. (2006) foi a técnica de submissão do estresse que utilizou pressão hidrostática positiva. No presente estudo foi utilizada pressão negativa, o que pode ter influenciado nos resultados. Neste sentido a comparação da resposta celular mediante diferentes técnicas de exposição a estresse controlado deve ser melhor estudada.

A hipótese de que a submissão dos espermatozoides equinos a um estresse controlado fornecido por pressão negativa modificaria a formação de ERO's foi refutada. Não foi observada alteração no potencial antioxidante total (FRAP – gráfico 1) bem como na formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO's – tabela 3) nas amostras estudadas. Fisiologicamente, as vias metabólicas de fosforilação oxidativa, provocam a alta produção de ERO's no sêmen equino e o seu desequilíbrio está relacionado com a capacidade oxidante (FERRUSOLA et al., 2010).

O metabolismo dos espermatozoides equinos é diferente dos observado em bovinos, suínos e ovinos. Apesar da presença bem caracterizada de proteínas transportadoras de glicose no sêmen equino, há uma diferença entre as espécies. Nos equinos a demanda energética não é atendida por vias glicolíticas, mas sim, usando a fosforilação oxidativa. Assim, há

modificação na formação de ERO's durante o consumo de ATP, devido a cadeia de transporte de elétrons mitocondriais durante a fosforilação oxidativa (GIBB et al. 2014; MORRELL et al., 2008; HALLIWELL et al., 2003). Este fato pode ter influenciado os resultados do presente trabalho.

Ball et al. (2001) verificaram que a baixa qualidade seminal tem correlação com a produção de ERO's. Espermatozoides com metabolismo e atividade de fosforilação oxidativa elevados, aumentam a produção de ERO's e peroxidação lipídica, melhorando as taxas de fecundação (GIBB et al., 2014). Esta correlação em humanos não é observada onde a elevação da produção de ERO's diminui a taxa de fertilidade (AITKEN et al., 1897). No presente estudo não foi observada alteração significativa na quantidade de ERO's e potencial antioxidante total nas amostras estudadas. Uma hipótese para este fato foi que a injúria causada pela exposição a pressão negativa não foi suficiente para causar um desequilíbrio entre a produção de ERO's e a capacidade antioxidante. Outro aspecto importante a ser levado em consideração foi que o diluente comercial utilizado apresenta grandes quantidades de antioxidantes o que pode ter influenciado nos resultados.

Um aspecto relevante que deve ser considerado quando se trabalho com ganhões refere-se a resposta individual na produção espermática, viabilidade seminal, congelabilidade e conseqüente fertilidade. Os resultados de FRAP mostraram diferença na resposta do ganhão frente ao tratamento P200. Porém este fato não foi observado nos demais parâmetros observados. A funcionalidade de membrana foi afetada, indicando que a pressão negativa leva a um carga de estresse, uma vez que 800mbar, apresenta a e menor taxa, de células viáveis durante o teste hiposmótico, o mesmo que a pressão negativa de 200mbar, causado uma perda na funcionalidade de membrana quando comparada ao grupo controle, a pressão intermediária (P500), apresenta níveis de funcionalidade iguais ao grupo controle, contudo, observa-se uma variação individual o grupo P200 na capacidade antioxidante total.

CONCLUSÃO

A submissão de pressão negativa como forma de estresse controlado não alterou a produção de ERO's, capacidade antioxidante total e cinética dos espermatozoides equinos. A pressão negativa gera um estresse que afeta a funcionalidade de membrana. E a P500 apresenta-se como a melhor opção entre as diferentes pressões estudadas, não sendo prejudicial a célula espermática. Contudo mais estudos devem ser realizados para melhor entender e desvendar os mecanismos da técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBINO, N. ; ZEMKE, G. ; OHLWEILER, L. U.; KLEIN, N. ; MOZZAQUATRO, F. D. ; VIEIRA, ARNALDO DINIZ ; MEZZALIRA A, JOANA CLAUDIA ; MEZZALIRA, A. . The exposure of bovine immature oocytes to Nitrocooler negative pressure enhances cryotolerance of in vitro produced blastocysts.. In: **International Congress on Animal Reproduction (ICAR), 2012, Vancouver CA. Reproduction in Domestic Animals - Proceedings of the 17th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)**. Berlin: Blackwell Verlag. v. 47, p. 439-439, 2012.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; RAMIRES NETO, C. Advances in stallion semen cryopreservation. **Vet. Clin. Equine**, v.32, p.521-530, 2016.
- BALL, B. A., et al. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 56, p. 577-589, 2001.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.
- BOCK, I.; LOSONCZI, E.; MAMO S.; POLGAR, Z.; HARNOS, A.; DINNYES, A; et al. Stress tolerance and transcriptional response in mouse embryos treated with high hydrostatic pressure to enhance cryotolerance. **Cryo Letters**. v. 31, n. 5, p. 401-412, 2010.
- CASALI, R.; SILVA, L. G.; ARCEGO, C. C.; MOZZAQUATRO, M. D.; MEZZALIRA, A. Negative Pressure in the Pre-freezing of Ram Semen. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 42, p.1240. 2014.
- COLE, J. A.; MEYERS, S. A.; Osmotic stress stimulates phosphorylation and cellular expression of heat shock proteins in rhesus macaque sperm. **J Androl**. v.32, n.4, p.402-410, 2011.
- DU, Y.; PRIBENSZKY, C. S.; MOLNAR, M.; ZHANG, X.; YANG, H.; KUWAYAMA, M.; High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification. **Reproduction**. v. 135, n. 1, p.13-17, 2008.
- DODARAN, H. V.; ZHANDI, M.; SHARAFI, M.; NEJATI-AMIRI, E.; NEJATI-JAVAREMI, A.; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A.; et al. Effect of ethanol induced mild stress on post-thawed bull sperm quality. **Cryobiology**. v. 71, n. 1, p. 12-17, 2015.
- GHOLAMI, D.; GHAFFARI S. M.; SHAHVERDI, A.; SHARAFI, M.; RIAZI, G.; FATHI R.; ESMAEILI, V.; HEZAVEHEI, M.; Proteomic analysis and microtubule dynamicity of human sperm in electromagnetic cryopreservation, **J. Cell. Biochem**. v. 119, p. 9483–9497, 2018.
- HEZAVEHEI, M.; KOUCHESFAHANI, H. M.; SHAHVERDI, A.; SHARAFI, M.; SALEKDEH, G. H.; EFTEKHARI-YAZDI, P.; FV- Preconditioning of sperm with sublethal nitrosative stress: a novel approach to improve frozen-thawed sperm function, **Reprod. Biomed**. v.38, p.413–425, 2019.

- HORVATH, A.; SZENCI, O.; NAGY, K.; VEGH, L.; PRIBENSZKY, C.; Stress preconditioning of semen before cryopreservation improves fertility and increases the number of offspring born: a prospective randomised study using a porcine model. **Reprod Fertil Dev.** v. 28, n.4, p.475-481, 2016.
- HUANG, S. Y.; PRIBENSZKY, C.; KUO, Y. H.; TENG, S. H.; CHEN, Y. H.; CHUNG, M. T. et al. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. **Anim Reprod Sci.** v.112, n.1-2, p.136-149, 2009.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEM, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; GRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics **J Reprod Fertil**, v.70, p. 219-225, 1984.
- MEZZALIRA, J. C.; OHLWEILER, L. U.; URIO, M.; NETO, S. G.; MARINHO, L. S. R.; ZAGO, F. C.; FORELL, F.; BERTOLINI, M.; MEZZALIRA, A. Effect of Nitrocooler negative pressure and recovery interval on cryotolerance of bovine in vitro-produced embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, n.1, p.210, 2010.
- MORAES, E. A.; COSTA, J. M. S.; SOUZA, W. L. Antioxidants improve membrane integrity and acrossome and sperm mitochondrial activity in ram sperm after cryopreservation. **Journal of Animal Science.** v.98, n.2, p.427-428, 2015.
- PAPA, F. O. et al. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. **Acta Scientiae Veterinariae.** v.33, p.19- 27, 2005.
- PINZON, J.; PINTO, M. G.; SILVA, A. M.; OHLWEILER, L. U.; GOETTEN, A.L.F.; CLAUDIA MEZZALIRA; Tratamento de oócitos com pressão negativa melhora a taxa de blastocistos eclodidos. In: **Reunião Anual da SBTE**, 2012, Foz do Iguaçu PR. Anais da Reunião Anual da SBTE, v. 9. p. 667-667, 2012.
- PRIBENSZKY, C. S.; MOLNAR, M.; HORVATH, A.; HARNOS, A. & SZENCI, O. Hydrostatic pressure-induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa [Abstract 109]. In: IETS Annual Conference (Orlando, Florida). **Reproduction, Fertility and Development.** 18(2): 162-163, 2006.
- PRIBENSZKY, C.; VAJTA, G.; MOLNAR, M.; DU, Y.; LIN L.; BOLUND, L.; YOVICH J. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. **Biol. Reprod.** v. 83, p. 690–697, 2010.
- PRIBENSZKY, C.; HORVATH, A.; VEGH, L.; HUANG, S. Y.; KUO, Y. H.; SZENCI, O. Stress preconditioning of boar spermatozoa: a new approach to enhance semen quality. **Reprod Domest Anim.** v. 46, Suppl. 2, p.26-30, 2011.
- SHARAFI, M.; ZHANDI, M.; SHAHVERDI, A.; SHAKERI, M. Beneficial effects of nitric oxide induced mild oxidative stress on post-thawed bull semen quality. **Int J Fertil Steril.** v.9, n.2, p.230-237, 2015.

5 CONCLUSÃO

O uso da pressão negativa afim de promover um estresse controlado, não alterou a produção de ERO's, cinética espermática e capacidade antioxidante total em espermatozoides equinos.

O estresse gerado pela pressão negativa afeta a funcionalidade de membrana. E a melhor opção entre as diferentes pressões estudadas foi a de 500mbar. Mesmo assim se faz necessária a realização de estudos com um maior número de indivíduos e repetições para determinação de conclusões definitivas sobre o efeito do estresse controlado induzido por pressão negativa na congelabilidade de espermatozoides equinos.

6 PERSPECTIVAS

- Os garanhões utilizados nesta pesquisa foram animais adultos, saudáveis, com histórico comprovado na reprodução e parâmetros de motilidade seminal desejáveis em exame andrológico. Mais estudos podem ser realizados verificando o efeito deste modelo de estresse controlado em animais com baixa qualidade seminal.
- A utilização do modelo de estresse controlado, com um espaço maior entre a exposição a injúria e o protocolo de congelamento poderia ser uma alternativa, visando o efeito de resposta da capacidade antioxidante frente a produção de ERO's, tal protocolo, deve ser testado em um estudo futuro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINO, N.; ZEMKE, G.; OHLWEILER, L. U.; KLEIN, N.; MOZZAQUATRO, F. D.; VIEIRA, A. D.; MEZZALIRA, A. J. C.; MEZZALIRA, A. The exposure of bovine immature oocytes to Nitrocooler negative pressure enhances cryotolerance of in vitro produced blastocysts.. In: **International Congress on Animal Reproduction (ICAR), 2012, Vancouver CA. Reproduction in Domestic Animals - Proceedings of the 17th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)**. Berlin: Blackwell Verlag, 2012. v. 47. p. 439-439.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; RAMIRES NETO, C. Advances in stallion semen cryopreservation. **Vet. Clin. Equine**, v.32, p.521-530, 2016.

AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. The importance of oxidative stress in determining the functionality of mammalian spermatozoa: A two-edged sword. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 18, 2020.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal funcion. In: MCKINNON, A. O.: VOSS, J. L.: **Equine Reproduction**, Filadelfia: Lea & Febiger, p. 715-745. 1992.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. *In*: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745, 1993.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.65-75, 2005.

BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; BAUMBER, J.; LIU, I. K. M. Catalase activity in equine semen. **Am. J. Vet. Res.** v.61, p.1026–1030, 2000.

Ball, B. A. et al. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 56, p. 577-589, 2001.

BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; CAIADO, J. R. C.; SOUZA, G. V.; SHIMOYA, A. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n. 12, p. 2115-2119, 2008.

BAUMBER, J. et al. The Effect of Reactive Oxygen Species on Equine Sperm. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895–902, 2000.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BRANDÃO, A. C. **Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide criopreservados de equinos**. Tese apresentada ao programa de pós graduação em reprodução animal da Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008.

BRINSKO, S. P. et al. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1641-1655, 1999.

BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clin Techn Equine Pract**, v.6, p.249-264, 2007.

CARVALHO, G. R. Fertility of the diluted equine semen, Cold to 20°C and transported. 1992. 87 f. **Thesis (Magister Scientiae) – Department of Animal Science Federal University of Viçosa**, Viçosa, Minas Gerais, 1992.

CANISSO, I. F.; ANDRADE SOUZA, F.; CAPISTRANO, S. E.; CARVALHO, G. R.; GUIMARÃES, A. C.; LINHARES LIMA, A. Artificial insemination in equines: diluted, cooled and transported race semen. **Rev. Acad. Ciênc. Agrár. Ambient.**, Curitiba, v.6, n. 3, p. 389-398, jul./set. 2008

CASALI, R.; SILVA, L. G.; ARCEGO, C. C.; MOZZAQUATRO, F. D.; A. MEZZALIRA. Negative Pressure in the Pre-freezing of Ram Semen. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.42, p.1240, 2014.

COCCHIA, N.; PASOLINI, M. P.; MANCINI, R.; PETRAZUOLLO, O.; CRISTOFARO, I.; ROSAPANE, I.; SICA, A.; TORTORA, G.; LORIZO, R.; PARAGIO, G.; MANCINI, A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, p.1201-1210, 2011.

CHAVEIRO, A.; MACHADO, L.; FRIJTERS, A. *et al.* Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bulls sperm using two osmotic supports. **Theriogenology**, v.65, p.1875-90, 2006.

COELHO, R. W. de A.; DIAS, J. C. O. Freezing equine semen after 24 hours of cooling. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. e1831019939, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i1.9939.

DE LAMIRANTE, E.; CAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa I. Effects on motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Society**, v. 13, n. 5, p. 368–378, 1992.

DAVIES-MOREL, M. C. G. **Equine Artificial Insemination**. Wallingford-Oxon: CAB International, p. 406, 1999.

DE LAMIRANDE, E. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48–54, 1997.

EHRENWALD, E.; FOOTE, R. H.; PARKS, J. E.; Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. **Mol Reprod Dev**, v.25, p.195-204, 1990.

FAGUNDES, B. T.; MAURICIO, F. V.; SILVA, J. F. S.; SHIMOYA, A.; BARRETO, M. A. P.; FERREIRA, V. M. Adição de insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39, n.2, p. 273-278, 2010.

FAO. **Live Animals**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA>>.

FEYZI, S.; SHARAFI, M.; RAHIMI, S. Stress preconditioning of rooster semen before cryopreservation improves fertility potential of thawed sperm. **Poultry Science**. v.97, n.7, p.2582-2590, 2018.

FRACZEK, M.; KURPISZ, M. The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. **Postepy Hig Med Dosw**. v. 59, p. 523–534, 2005.

FÜRST, V. ; CARVALHO, R. G.; FÜRST, M. C. O.; RUAS, J. R. M.; BORGES, A. M.; MAFILLI, V. Effect of freezing and thawing protocols on post-thaw quality of equine semen. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.57, n.5, p.599-607, 2004.

FREY, B.; JANKO, C.; EBEL, N.; MEIISTER, S.; SCHLUCKER, E.; MEYER-PITTROFF, R. et al. Cells under pressure - Treatment of Eukaryotic Cells with High Hydrostatic Pressure, from Physiologic Aspects to Pressure Induced Cell Death. **Current Medicinal Chemistry**. v.15, p.2329-2336, 2008.

GARCÍA, B. M.; FERNÁNDEZ, L.G.; FERRUSOLA, C. O.; RODRÍGUEZ, A. M.; BOLAÑOS, J. M. G.; MARTINEZ, H. R. et al. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**. v.75, p.811–8, 2011.

GOMES, G. M.; JACOB, J. C. F.; MEDEIROS, A. S. L. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Machador breed. **Theriogenology**, v.58, n.2-4, p.277-299, 2002.

GUERRA, M. M. P.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. The role of oxidants and antioxidants on andrology. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.28, p.187-195, 2004.

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

GRAHAN, J. K. Principles of cooled semen. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (ed), **Equine reproduction**, vol 1, 2nd ed. Wiley-Blackwell, Chichester, United Kingdom, cap.127, p.1308-1315, 2011.

HECKENBICHLER, S.; DEICHSEL, K.; PETERS, P.; AURICH, C. Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. **Theriogenology**, v. 75, p.849-856, 2011.

HEZAVEHEI, M.; MOHSENI KOUCHESFAHANI, H.; SHAHVERDI, A. H.; SHARAFI, M.; HOSSEINI SALEKDEH, G. H.; EFTEKHARI-YAZDI, P. Induction of sublethal

oxidative stress on human sperm before cryopreservation: a time-dependent response in post-thawed sperm parameters. **Cell J.** v.20, n.4, p.537-543, 2019. doi: 10.22074/cellj.2019.5639.

JASKO, D. J.; HATHAWAY, J. A.; SCHALTENBRAND, V. L.; SIMPER, W. D.; SQUIRES, E. L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, p.1241-1252, 1992.

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAREZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. I. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-225, 1984.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J. E.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**. v.63, n.5, p.1354–1365, 2005.

KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W. L.; MORSE, G. W. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: **Proceedings of the 21st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, 327. 1975.

LAGARES, M. A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Assessing equine sperm membrane integrity. **Andrologia**, v.32, p.163-167, 2000.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v.165, p.1–10, 1998.

LIPOSKI, D. M.; OHLWEILER, L. U.; MEZZALIRA, J. C.; BROGNI, C.F. ; SILVA, L.G.; MEZZALIRA, A. Células fetais bovinas de cultivo primário submetidas a diferentes pressões negativas antes do congelamento em palhetas. **Ciência animal brasileira**. v. 19, p. 1-11, 2018.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. **Veterinary Clinics North American Equine Practice**, v.22, n.3, p.663-676, 2016.

MAPA. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. p. 54, 2016.

MALMGREN, L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. **Theriogenology**, v.50, p.833-839, 1998.

MEDEIROS, A. S. L.; FERREIRA, H. N.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Índices de fertilidade de espermatozoides de garanhões submetidos ao estresse osmótico por diferentes crioprotetores. **Acta Sci. Vet.**, v.3, p.35, 2007.

MEZZALIRA, J. C.; OHLWEILER, L. U.; URIO M.; NETO, S. G.; MARINHO, L. S. R.; ZAGO, F. C.; FORELL, F.; BERTOLINI, M.; MEZZALIRA, A.; Effect of Nitrocooler

negative pressure and recovery interval on cryotolerance of bovine in vitro-produced embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, n.1, p.210, 2010.

MIES FILHO, A. (1987). **Reprodução dos Animais Domésticos**. (6a ed.), Sulina, 115-119.

MISLEI, B.; BUCCI, D.; MALAMA, E.; BOLLWEIN, H.; MAR, G. Seasonal changes in ROS concentrations and sperm quality in unfrozen and frozen-thawed stallion sêmen. **Theriogenology**. v.144, p. 89-97, 2020.

MORTE, M. I.; RODRIGUES, A. M.; SOARES, D.; RODRIGUES, A. S.; GAMBOA, S.; RAMALHO-SANTOS, J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Anim Reprod Sci**. v.106, n.1-2, p.36-47, 2008.

MORAES, E. A.; COSTA, J. M. S.; SOUZA, W. L. Antioxidants improve membrane integrity and acrossome and sperm mitochondrial activity in ram sperm after cryopreservation. Joint Annual Meeting. **Journal of Animal Science**. v.98, n.2, p.427-428, 2015.

NUNES, D. B.; ZORZATTO, J. R.; COSTA E SILVA, E. V.; ZUCCARI, C. E. S. N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple design cooling system. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.434–439, 2008.

O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M. T. Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **International Journal of Andrology**. v.26, n.2, p.109-114, 2003.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. v.95, p. 351-358, 1979.

PAPA, F. O. *et al.* Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.19- 27, 2005.

PINZON J.; PINTO, M. G.; SILVA, A. M.; OHLWEILER, L. U.; GOETTEN, A.L.F.; MEZZALIRA, JOANA CLAUDIA; MEZZALIRA, A. . Tratamento de oócitos com pressão negativa melhora a taxa de blastocistos eclodidos. In: **Reunião Anual da SBTE**, 2012, Foz do Iguaçu PR. Anais da Reunião Anual da SBTE, v. 9. p. 667-667, 2012.

PRIBENSZKY, C. S.; MOLNAR, M.; CSEH, S. & SOLT, L. Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge. **Reproduction, Fertility and Development**. **Animal Reproduction Science**. v.87, n.1-2, p.143-150, 2005.

PRIBENSZKY, C. S.; MOLNAR, M.; HORVATH, A.; HARNOS, A.; SZENCI, O. Hydrostatic pressure-induced increase in post-thaw motility of frozen boar spermatozoa [Abstract 109]. In: IETS Annual Conference (Orlando, Florida). **Reproduction, Fertility and Development**. v.18, n.2, p.162-163, 2006.

- PRIBENSZKY, C.; HORVATH, A.; VEGH, L.; HUANG, S. Y.; KUO, Y. H.; SZENCI O. Stress preconditioning of boar spermatozoa: a new approach to enhance semen quality. **Reprod Domest Anim.** v.46, n.2, p.26-30, 2011.
- PRIEBENSZKY, C. S.; VAJTA, G. Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes and embryos performance. **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p 48-55, 2011.
- ROMEK, M.; KUCIA, M.; GAJDA, B.; KRZYSZTOFOWICZ, E.; SMORAG, Z. Effect of high hydrostatic pressure on mitochondrial activity, reactive oxygen species level and developmental competence of cultured pig embryos. **Theriogenology.** v.140, p.99-108, 2019.
- SHARAFI, M.; ZHANDI, M.; SHAHVERDI, A.; SHAKERI, M. Beneficial effects of nitric oxide induced mild oxidative stress on post-thawed bull semen quality. **Int. J. Fertil. Steril.** v.9, n.2, p.230-237, 2015.
- SCHOBBER, D. et al. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology.** v. 68, p. 745–754, 2007.
- STOREY, T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative B. damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction.** v.3, p.203–213, 1997.
- TÖPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Anim. Reprod. Sci.**, v.89, p.159-170, 2005.
- VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; MEYERS, P. J.; MEYERS, S. A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. **Theriogenology**, v.32, p.515-525, 1989.
- WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. **Oxford Reviews Reproduction and Biology.** v.1, p.183-350, 1979.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60, n. 61, p. 481–492, 2000.
- WEMEKAMP-KAMPHUIS, H.; KARATZAS, A.; WOUTERS, J. Enhanced Levels of Cold Shock Proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon Exposure to Low Temperature and High Hydrostatic Pressure **Applied and environmental microbiology**, p.456–463, 2002.
- YANAGUIMACHI, R. In. E. KNOBIL, J. D. NEILL (Eds.), **The Physiology of Reproduction**, Raven Press, New York, p. 189-317, 1994.