

CRIOPRESERVAÇÃO E CRIOPROTETORES NA PROTEÇÃO DO ESPERMATOZOIDE SUÍNO

(Cryopreservation and cryoprotectors in protection of the swine sperm)

Wildelfrancys Lima de SOUZA*; Lina Raquel Santos ARAÚJO; Ricardo TONIOLLI

¹Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus Itaperi, Fortaleza/CE. CEP: 60.740-000. *E-mail: wilde@zootecnista.com.br

RESUMO

O uso de sêmen congelado apresenta menores índices de concepção e menor número de leitões nascidos por parto. Isso ocorre porque a criopreservação acarreta variações de temperatura, alteração da permeabilidade espermática e processos oxidativos, sendo que o sêmen suíno apresenta, naturalmente, baixa capacidade antioxidante e sofre estresse oxidativo. No entanto, vários crioprotetores são utilizados para diversas espécies e já é descrito o uso de colesterol, carregado com ciclodextrina, e de aminoácidos, visando a melhoria do sêmen após o descongelamento. A adição de colesterol ao sêmen, previamente à criopreservação, mantém a integridade da membrana acrossomal e retarda a capacitação espermática, feito que pode ser facilitado com o carregamento por ciclodextrina. Em paralelo, pesquisas apontam a importância do uso de aminoácidos no sêmen, que formam uma camada de proteção térmica que preserva a integridade da célula espermática, além de apresentarem função osmorregulativa. Nesse sentido, a viabilização da criopreservação do sêmen suíno favorece o melhoramento genético, minimiza a transmissão de patógenos e possibilita a formação de um banco de germoplasma. Para tanto, faz-se necessário o aprimoramento do uso de crioprotetores em uma proporção ideal, que mantenha a integridade da membrana espermática e não prejudique a capacitação espermática e a reação acrossomal, necessárias para a fecundação.

Palavras-chave: Cachaço, ciclodextrina, congelação, crioprotetores.

ABSTRACT

The use of frozen semen presents lower conception rates and fewer piglets born per birth. This is due to the fact that cryopreservation causes variations in temperature, changes in sperm permeability and oxidative processes, and the swine semen naturally presents low antioxidant capacity and undergoes oxidative stress. However, several cryoprotectants are used for several species, and the use of cyclodextrin and amino acid-loaded cholesterol is already described, aiming to improve the semen after thawing. The addition of cholesterol to the semen prior to cryopreservation maintains the integrity of the acrosomal membrane and slows sperm capacitation, which can be facilitated by cyclodextrin loading. In parallel, research indicates the importance of the use of amino acids in the semen, which form a layer of thermal protection that preserves the integrity of the sperm cell, in addition to presenting osmorregulatory function. In this sense, the viability of the cryopreservation of the swine semen favors the genetic improvement, minimizes the transmission of pathogens and allows the formation of a germplasm bank. Therefore, it is necessary to improve the use of cryoprotectants in an ideal proportion, which maintains the integrity of the sperm membrane and does not detract from the sperm capacitation and acrosomal reaction required for fertilization.

Key words: Boar, cyclodextrin, freezing, cryoprotectants.

INTRODUÇÃO

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas sobre diferentes aspectos do processo de criopreservação de sêmen suíno (TONIOLLI *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2018) e ajudando a melhorar os resultados de fertilidade do sêmen em programas de inseminação artificial (IA) (PYLES, 2013). No entanto, ainda existem inúmeros pontos, no processo de

criopreservação, a serem melhorados, buscando a aplicabilidade do sêmen criopreservado com a mesma eficiência do sêmen resfriado (DAVOODIAN *et al.*, 2017; YESTE *et al.*, 2017).

A utilização do sêmen suíno congelado, sem alteração da qualidade espermática e, conseqüentemente, dos resultados de fertilidade, é um dos entraves da biotecnologia da reprodução nesta espécie. Fatores como o crioprotetor utilizado e as mudanças de temperatura resultam em crioinjúrias dos espermatozoides, sendo um grande obstáculo na obtenção de um sêmen de boa qualidade pós-descongelamento (YESTE *et al.*, 2017).

O glicerol tem sido muito utilizado como crioprotetor, entretanto, outras substâncias também têm a capacidade de proteger os espermatozoides na criopreservação, tais como alguns aminoácidos (DAVOODIAN *et al.*, 2017). Durante o processo de congelamento/descongelamento, ocorre a indução da fase de transição dos lipídeos da membrana plasmática (MP), que resulta no efluxo do colesterol e provoca uma desestabilização da membrana (CROCKETT, 1998). A fim de minimizar essa mudança de fase e aumentar a relação colesterol:fosfolipídeos da membrana, o colesterol carregado com ciclodextrina (CCC) vem sendo utilizado para aumentar a viabilidade espermática pós-criopreservação, em algumas espécies (MOCÉ *et al.*, 2010a; CHUAYCHU-NOO *et al.*, 2017; SALMON *et al.*, 2017).

Dessa forma, a incorporação de moléculas, como o colesterol e os aminoácidos, em protocolos de criopreservação do sêmen suíno, pode aumentar a proteção da membrana espermática e a viabilidade dos espermatozoides nesses procedimentos (SANGEETA *et al.*, 2015; SALMON *et al.*, 2017).

DESENVOLVIMENTO

A célula espermática durante a criopreservação

Durante o processo de criopreservação, inúmeros danos são causados à célula espermática, o que reduz a quantidade de células viáveis, bem como sua capacidade funcional. As lesões ocasionadas têm sido atribuídas à variação de temperatura, aos danos oxidativos, às alterações de membrana e DNA, além da toxicidade de crioprotetores e do estresse osmótico (YESTE, 2017). Esses danos levam ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática, à inibição da atividade enzimática e à alteração do balanço bioenergético celular (FAHY, 1996). Todas as espécies apresentam particularidades na célula espermática quanto ao potencial de crioproteção, devido às suas características intrínsecas (LADHA, 1998).

A criopreservação de sêmen suíno é um grande desafio, devido às particularidades de sua célula espermática, quando comparada com a de outras espécies. Ela possui uma menor porcentagem de moléculas de colesterol em sua membrana plasmática, distribuídas de forma assimétrica, com maior disposição na monocamada interna (WATSON, 1995). Essas diferenças estruturais contribuem para sua sensibilidade ao choque térmico, com redução da motilidade e dos danos funcionais de membrana e acrossoma (SARAVIA *et al.*, 2005).

Outra particularidade do espermatozoide é a grande concentração de ácidos graxos insaturados nos fosfolipídios presentes na membrana plasmática, com poucas ligações duplas do tipo *cis* (CEROLINI *et al.*, 2000), tornando esta célula suscetível à peroxidação lipídica,

devido ao estresse oxidativo produzido pelas espécies reativas de oxigênio (EROs). A produção excessiva e desequilibrada das EROs resulta em danos da membrana plasmática, inibição da respiração e vazamento de enzimas intracelulares (TAVILANI *et al.*, 2008). Este fato é agravado pela baixa capacidade antioxidante do plasma seminal suíno (HE *et al.*, 2020).

Além dessas particularidades, a espécie suína ainda apresenta uma grande variação entre raças e entre ejaculados de diferentes indivíduos da mesma raça (CORCINI *et al.*, 2012; ZAJA *et al.*, 2016; PRIETO-MARTINEZ *et al.*, 2017). Isso demonstra uma possível relação genética no processo de criopreservação, capaz de influenciar em uma expressão proteica ou lipídica na composição da membrana, ou, ainda, em alterações na composição do plasma seminal ou na funcionalidade das glândulas acessórias (HOLT *et al.*, 2005).

CONSERVAÇÃO DO SÊMEN SUÍNO

Refrigeração

O processo de refrigeração do sêmen suíno, compreende etapas relativamente simples, mas que devem ser realizadas com o devido cuidado para manutenção da qualidade do sêmen conservado. O ejaculado suíno deve atender a alguns requisitos para ser submetido à refrigeração, como apresentar vigor ≥ 3 e motilidade $\geq 70\%$, aspecto leitoso e odor *sui generis* (CBRA, 2013). Para obter uma melhor qualidade do sêmen refrigerado, o ejaculado deve ser diluído em até 20 minutos após a coleta, estando o diluente na mesma temperatura ou, no máximo, um grau abaixo da temperatura do ejaculado. Após a diluição, o sêmen é envasado e deve permanecer por algumas horas em ambiente climatizado (24 °C), antes de ser armazenado entre 15 e 17 °C até o seu uso (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

A conservação do sêmen sob refrigeração, apesar de ser uma técnica muito utilizada na suinocultura, tem o seu uso restrito a um período de dois a três dias após a coleta, quando são utilizados diluentes comuns, de curta duração (WATSON, 2000). A expectativa pelo prolongamento do tempo de conservação do sêmen continua sendo um grande desafio (PINART *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2016).

Durante a conservação do sêmen entre 15 a 17 °C, ocorre um desequilíbrio iônico intra e extracelular, que pode reduzir a motilidade espermática e levar a problemas de fertilidade, porém, sem efeitos deletérios significativos (YESTE, 2017). Até a temperatura de 5 °C, ocorre redução da fluidez dos lipídeos na membrana do espermatozoide suíno, o que poderia explicar sua maior sensibilidade ao resfriamento (BUHR *et al.*, 2000). Nessa faixa de temperatura, ocorre significativa redução da motilidade espermática (TONIOLLI *et al.*, 2013), sendo esse fato relevante para a conservação dos espermatozoides de suínos.

Criopreservação

O processo de criopreservação é outra forma de conservação do sêmen. Nessa técnica, amostras de espermatozoides são submetidas à refrigeração controlada, até a congelação/descongelação, visando preservar a sua função, que é a fecundação do oócito (YESTE, 2017). Entretanto, a técnica é raramente executada na prática comercial de suínos. As principais razões para isso são as baixas taxas de sobrevivência dos espermatozoides e, conseqüentemente, a elevada concentração de células exigida na dose de inseminação (De

AMBROGI *et al.*, 2006), além da baixa taxa de fertilidade e de um menor número de leitões nascidos (WATSON, 2000). Todavia, a criopreservação é uma técnica valiosa, especialmente para a conservação dos recursos genéticos ou para garantir um fornecimento comercial constante de doses de sêmen, no caso de um problema epidemiológico temporário ou de diminuição da produção de sêmen (CEROLINI *et al.*, 2001).

Apesar do sêmen suíno congelado estar disponível comercialmente desde a década de 1970, mais de 99% das IAs feitas em todo o mundo são realizadas com sêmen diluído e utilizado no dia da colheita ou armazenado entre 15 a 20 °C, até 5 dias. Assim, menos de 1% de todas as IAs são feitas utilizando o sêmen suíno criopreservado (JOHNSON *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2019).

Diversos estudos sugerem que espermatozoides de diferentes espécies possuem propriedades criobiológicas específicas e graus de sensibilidade variados na manipulação, no choque térmico, na congelação e na tolerância osmótica (PURDY, 2006).

Além de diferenças relacionadas à especificidade de espécies, são observadas variações entre indivíduos, entre ejaculados de um mesmo indivíduo e dentro de um mesmo ejaculado, com as diferentes frações espermáticas e seus graus de qualidade, além de variações entre subpopulações espermáticas (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003), o que pode explicar, em parte, as diferentes respostas à criopreservação do sêmen de um mesmo. Além disso, a criopreservação afeta não somente os parâmetros de motilidade e viabilidade, mas, também, a integridade da membrana do espermatozoide reprodutor (PRIETO-MARTINEZ *et al.*, 2017).

As alterações na membrana dos espermatozoides, vem sendo atribuídas aos processos ocorridos durante a conservação do sêmen, quando cerca de 10 a 50% dos espermatozoides de um ejaculado não resistem ao processo de congelação e morrem (WATSON, 2000). Outro fato que ocorre, durante a etapa *in vitro*, é que as células espermáticas têm a capacidade de capturar lipídeos e ácidos graxos do meio diluente para utilizá-los em seu próprio metabolismo (CEROLINI *et al.*, 2001).

Efeitos da criopreservação

O processo de criopreservação espermática, além de possibilitar sua utilização por período indeterminado, também reduz riscos e custos com aquisição e transporte de reprodutores, favorecendo uma rápida difusão de material genético (CASTELO *et al.*, 2008). Todavia, a criopreservação espermática é um processo que promove grande estresse e impõe às células condições muito desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade (PURDY, 2006).

Os danos provocados à célula espermática, na criopreservação do sêmen suíno, resultam em quedas de 20 a 30% nas taxas de concepção e uma diminuição no número de leitões nascidos vivos, em comparação com as taxas obtidas com sêmen refrigerado (WONGTAWAN *et al.*, 2006). As baixas taxas de fertilidade do sêmen descongelado ocorrem porque cerca de 40 a 50% das células não sobrevivem (WATSON, 2000). Além disso, os gametas restantes apresentam baixa motilidade e integridade de membrana, além de menor tempo de sobrevivência no trato reprodutivo feminino (4h vs 24h) (WABERSKI *et al.*, 1994). Essa queda da fertilidade é devido à sensibilidade ao choque térmico (FLESCHE e GADELLA, 2000), ao estresse osmótico (AITKEN e KRAUSZ, 2001) e, até mesmo, à

formação de cristais de gelo intracelulares, durante a congelação, e extracelulares, durante a descongelação (FLESCH e GADELLA, 2000).

Durante o resfriamento do sêmen, na técnica de congelação, pode ocorrer o choque térmico, definido pelo conjunto de alterações ocorridas na célula espermática submetida à refrigeração rápida e a temperaturas próximas aos 5 °C. Ele resulta no decréscimo irreversível da motilidade, em mudanças bioquímica e no funcionamento desses gametas, incluindo: redução da taxa de glicólise, respiração celular e frutólise, aumento da degeneração do ácido desoxirribonucleico e liberação de material intracelular (WATSON, 2000).

Outro ponto crítico da criopreservação é o “efeito solução”, caracterizado pela desidratação excessiva da célula, em meios de elevada concentração de solutos, modificação do pH e conseqüente alteração na função do espermatozoide (FAHY, 1980). Segundo Watson (1995), quando a célula espermática é submetida à congelação lenta, há tempo suficiente para que grande quantidade de água intracelular migre para o ambiente extracelular, estabelecendo o equilíbrio entre solvente e soluto.

O processo de congelação rápida, aliado à descongelação lenta, pode favorecer a formação de pequenos cristais de gelo, que se agrupam formando grandes cristais, que rompem a membrana (WATSON, 2000). Importante salientar que a curva de congelação ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozoides se desidratem e rápida o bastante para evitar que as células fiquem expostas por muito tempo a elevadas concentrações de soluto (SNOECK, 2003).

A membrana plasmática de espermatozoides é rica em fosfolipídeos e fisiologicamente assimétrica, com fosfatidilcolina e esfingomiéline localizadas no folheto externo da bicamada lipídica, enquanto fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina encontram-se no folheto interno. Durante a criopreservação, ela sofre modificações para se adequar às mudanças de temperatura, como o movimento de translocação de fosfolipídeos, com externalização da fosfatidilserina (LADHA, 1998). Os mecanismos envolvidos na troca dos lipídeos entre os folhetos da MA, como a fosforilação da tirosina e efluxo de colesterol, vistos nos espermatozoides criopreservados (SILVA e GADELLA, 2006), diferem daqueles do processo fisiológico da capacitação (BERNECIC *et al.*, 2019), pois a criopreservação provoca, na membrana plasmática, estado de maior fluidez e exposição a sítios de ligação a moléculas externas, requerendo menor tempo para a célula se capacitar.

Durante os últimos anos, surgiram inúmeros aperfeiçoamentos para a técnica de criopreservação do sêmen suíno, incluindo modificações das taxas de congelação-descongelação (CÓRDOVA-IZQUIERDO *et al.*, 2006) e mudanças na composição dos diluentes de sêmen, com o uso da água de coco em pó, em protocolos de criopreservação do sêmen suíno (GUIMARÃES *et al.*, 2018).

Crioprotetores penetrantes e não penetrantes

Crioprotetor é a nomenclatura dada para qualquer substância que ofereça proteção às células contra os danos ocasionados pela redução de temperatura, além da manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada (PURDY, 2006). Com o intuito de reduzir os danos causados durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se boas para essa finalidade. Os crioprotetores, utilizados na congelação de sêmen, têm a função de evitar a formação de cristais de gelo intra e

extracelular, reduzir o estresse osmótico pela reposição da água necessária para manutenção do volume celular, interagir com íons e macromoléculas, reduzir o ponto de congelação da água, assim como servir de tampão para ajustes de possíveis alterações do potencial de hidrogênio - pH (MEDEIROS *et al.*, 2002).

Uma gama de substâncias tem sido utilizada visando uma proteção adequada às células espermáticas, durante a criopreservação. Elas foram divididas em crioprotetores penetrantes e não penetrantes. Alguns componentes do diluente de criopreservação são classificados como crioprotetores extracelulares ou não penetrantes, os quais são representados por macromoléculas com peso molecular elevado, tais como açúcares complexos (rafinose e trealose), lipoproteínas da gema do ovo, água de coco (NUNES, 2002) e alguns aminoácidos, que atuam por meio de efeito osmótico, prevenindo a formação de cristais de gelo no meio extracelular (SANGEETA *et al.*, 2015). Tem-se também os crioprotetores intracelulares ou penetrantes, os quais foram classificados em dois grupos: alcoólicos e amidas (ALVARENGA *et al.*, 2005).

Dentre os crioprotetores alcoólicos, utilizados para a preservação espermática, destacam-se, especialmente, o glicerol, o etilenoglicol e o dimetilsulfóxido (DMSO) (FICKEL *et al.*, 2007). Entre as amidas, citam-se a acetamida, a lactamida (KASHIWAZAKI *et al.*, 2006), a dimetilformamida (OLIVEIRA *et al.*, 2006) e a dimetilacetamida (CALDERAM *et al.*, 2008).

A gema de ovo é o crioprotetor externo mais utilizado em protocolos de congelação, fornecendo proteção para os espermatozoides contra choque térmico, especialmente em temperaturas abaixo de 15 °C (NEVES e HENRY, 2012; TONIOLLI *et al.*, 2013). Essa característica é devido à sua constituição por lipoproteínas de baixa densidade, capazes de associarem-se à membrana plasmática, diminuindo a perda de fosfolípidios e colesterol (BERGERON *et al.*, 2004). O seu efeito protetor pode ser melhorado pela adição de *Orvus Es Past* (OEP), também conhecido como *Stm Equex*[®], detergente sintético baseado em sódio e laurel sulfato de trietanolamina. Tem sido, também, sugerido que a OEP dá proteção, pois modifica os constituintes da gema de ovo no diluente (ROCHA *et al.*, 2015).

No entanto, por ser a gema de ovo um produto de origem animal, é propensa a uma variação em sua composição dependente do animal, da origem e da nutrição (HOUPALATHI *et al.*, 2007). Muitos estudos buscam o preparo de meios quimicamente definidos para sua substituição, a exemplo das lecitinas de soja (HIWASA *et al.*, 2009), trealose e glicina (VALENTE *et al.*, 2010) ou, ainda, da própria lipoproteína de baixa densidade purificada (DZIEKOŃSKA *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2019).

Os crioprotetores penetrantes são substâncias que atuam tanto no meio intra como no extracelular, sendo mais comumente utilizados o glicerol, o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido e as amidas (ALVARENGA *et al.*, 2005). O uso do glicerol como crioprotetor interno (permeável à membrana) desidrata e reduz o ponto crioscópico do interior das células, dificultando a formação de cristais de gelo intracelular (WATSON, 1995). O glicerol é utilizado em concentrações finais inferiores a 4%, pois tem uma potencial ação tóxica ao ser metabolizado como fonte de açúcar pela célula, sendo responsável pela produção de metilglioxal, que é um mediador da ativação de fosfolipases e proteases, provocando irreversíveis danos à célula (SARTORI e BECHARA, 2010; ANDRADE *et al.*, 2019).

Membrana do espermatozoide suíno

Todas as células procariontes ou eucariontes são circundadas por uma membrana, o que define a sua delimitação, separando seu conteúdo interno do meio que a circunda. Por servir de barreira seletiva, a MP determina a composição do citoplasma celular e tem papel fundamental na maioria dos fenômenos celulares. Ela é composta por uma dupla camada de fosfolípídeo e proteínas associadas (COOPER, 1996). As membranas espermáticas seguem esse modelo clássico, entretanto, nos espermatozoides de mamíferos, elas se apresentam organizadas em domínios regionais bem delineados, que diferem em composição e função (LOPEZ-SALGUERO *et al.*, 2020).

Na cabeça do espermatozoide, a MP possui dois domínios maiores, a região acrossomal e a região pós-acrossomal. Na região acrossomal, a membrana pode ser subdividida em segmento marginal (apical), principal (acrossomal) e equatorial, sendo que os segmentos marginal e principal, juntos, são denominados de capa acrossomal. No flagelo, observa-se o domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial, e o domínio da cauda posterior, que cobre a peça principal e terminal da cauda (EDDY e O'BRIEN, 1994).

A membrana plasmática tem relevante papel na capacidade fertilizante das células, modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, bem como no trânsito e armazenagem no epidídimo, no trato genital feminino e, finalmente, na capacitação e penetração do oócito (VICENTE-CARRILLO *et al.*, 2016). Portanto, ela deve ter integridade física e funcional para que a célula tenha viabilidade e capacidade fecundante normais.

O acrossoma é importante por conter enzimas hidrolíticas necessárias para penetração dos ovócitos e estar intimamente associado à fecundação (RODRIGUES-MARTINEZ *et al.*, 1997). Além disso, essa estrutura é parte fundamental nos processos de fecundação e qualquer alteração pode inibir esta capacidade no espermatozoide (BENNERMANN *et al.*, 2000).

Nos suínos, as principais diferenças na MP são: menor porcentagem de moléculas de colesterol e sua distribuição de maneira assimétrica; maior quantidade de glicerol na monocamada interna do que na externa; uma quantidade menor de fosfatidilcolina e maior de fosfatidiletanolamina e esfingomiéline; diferenças na composição dos ácidos graxos dos fosfolípídeos, com poucas duplas ligações do tipo *cis* (JOHNSON *et al.*, 2000). No choque térmico, ocorre aumento da permeabilidade da membrana espermática e consequente perda de cátions e enzimas, redução da atividade enzimática e dos processos de difusão e mudanças no movimento lateral dos canais iônicos (JOHNSON *et al.*, 2000).

Função do colesterol na criopreservação

O colesterol tem grande importância na célula espermática, desde a proteção da integridade das membranas até a capacitação espermática (BERNECIC *et al.*, 2019). A produção do colesterol começa cedo na formação da célula espermática, onde, primariamente, ocorre a expressão de genes colesterogênicos, nas células germinativas dos machos. Estudos sugerem que sua síntese se inicia em espermatócitos na fase de paquíteno e espermátides redondas (SHI *et al.*, 2018).

As mudanças que ocorrem, durante o processo de capacitação, são dependentes do rearranjo do colesterol na MP (BERNECIC *et al.*, 2019). Em uma das hipóteses, o colesterol excretado pelas células do epidídimo contribui para a maturação dos espermatozoides em

trânsito (SAEZ *et al.*, 2011). Durante o transporte pelo epidídimo, o conteúdo de colesterol na MP diminui em 50%, em ratos (REJRAJI *et al.*, 2006). Porém, em algumas espécies, o teor de colesterol aumenta durante a maturação dos espermatozoides, como nos caprinos (RANA *et al.*, 1991), ou permanece inalterado, como nos suínos (NIKOLOPOULOU *et al.*, 1985).

O colesterol é um fator potente decapacitante, que serve para estabilizar a MP do espermatozoide, durante o trânsito do epidídimo, e evitar as interações intermoleculares responsáveis pela capacitação (DAVIS, 1980). A perda de colesterol aumenta a fluidez da MP, como é visto em humanos (HAMDI *et al.*, 2010), o que é necessário para os passos finais da maturação do espermatozoide, no trato reprodutivo feminino. Contudo, essa remoção do colesterol está restrita à fração da membrana (BOERKE *et al.*, 2008).

No entanto, pesquisas têm demonstrado que a incorporação do colesterol, na membrana espermática, protege a célula espermática durante o resfriamento, além de reduzir os danos decorrentes da criopreservação (MORAES *et al.*, 2015, SOUZA *et al.*, 2016; LONE *et al.*, 2016; CHUAYCHU-NOO *et al.*, 2017; SALMON *et al.*, 2017) e promover a estabilização e modulação da fluidez da membrana (LEE *et al.*, 2015; LONE, 2018).

Espermatozoides de espécies como humanos, coelhos e macacos têm menor sensibilidade ao choque térmico, durante o processo de congelamento. Acredita-se que essa maior resistência é devido a uma melhor relação na proporção colesterol/fosfolípidos e uma maior quantidade de ácidos graxos saturados em suas membranas, quando comparados com espécies mais suscetíveis, como bovinos, ovinos e suínos (LONE, 2018). A relação colesterol da membrana/fosfolípídeo tem um papel importante na resistência espermática ao choque térmico e sua quantidade de colesterol pode ser regulada pelo uso de ciclodextrinas (RAJORIYA *et al.*, 2016).

Ciclodextrina e colesterol

As ciclodextrinas (CDs) são da família de oligômeros cíclicos de glicose, que têm uma superfície polar e uma cavidade hidrófoba, com um diâmetro de 5-8 Å, que pode acomodar pequenas moléculas. CDs são nomeadas de acordo com o número de unidades de glicose presentes na sua estrutura: α , β ou γ -CD se contiverem seis, sete ou oito anéis de sacarose, respectivamente (SANCHEZ *et al.*, 2011). Ela é capaz de formar complexos de inclusão com diversas moléculas que precisam satisfazer apenas uma condição, a de se encaixar inteira ou parcialmente na cavidade da ciclodextrina (CHALLA *et al.*, 2005).

Quando essas CDs são pré-carreadas com colesterol (CCC), elas podem inserir o mesmo nas membranas das células (SALMON *et al.*, 2017). Devido à sua porção hidrofílica, as CDs podem solubilizar moléculas hidrofóbicas. Além disso, a adição de resíduos metil ou hidroxipropil nas CDs aumenta sua solubilidade em água e a sua capacidade para dissolver compostos hidrofóbicos, assim, a metil- β -ciclodextrina e 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina tem uma maior eficiência no tratamento espermático, especialmente em carneiros (MOCÉ *et al.*, 2010b).

Os espermatozoides, geralmente, são tratados por protocolos com concentrações de CCC entre 1 a 2mg/120 x10⁶ spz, com uma exposição ao tratamento durante 15 minutos em temperatura ambiente, o que é suficiente para a transferência de colesterol para os espermatozoides (MOCÉ *et al.*, 2010a; SALMON *et al.*, 2017). Esse tratamento aumenta o teor de colesterol em 2 a 3 vezes em touros, búfalos, carneiros e garanhões (MOCÉ *et al.*,

2010b; RAJORIYA *et al.*, 2016; SALMON *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2018). Esse colesterol adicional eleva a relação colesterol:fosfolipídios dos espermatozoides para uma relação (>0,8), semelhante ao de espermatozoides que não são sensíveis ao choque térmico. O influxo de colesterol, por meio da ciclodextrina, aumenta, também, eficientemente o grau de preservação das membranas plasmática e acrossomal (MOCÉ *et al.*, 2010b).

Aminoácidos

Os aminoácidos (AAs) são moléculas carregadas, sendo possível que interajam, eletrostaticamente, com os grupos fosfato dos fosfolipídios da MP do espermatozoide, formando, assim, uma camada sobre a superfície da célula, protegendo-a contra choques térmicos (EL-SHESHTAWY *et al.*, 2008). A descoberta do papel biológico dos AAs, na prevenção de danos à célula, surgiu a partir da observação de uma variedade de plantas que são capazes de acumular o aminoácido prolina em resposta à temperatura fria (TONHATI, 2018). Também, tem sido relatado que alguns AAs protegem diversos tipos de células animais contra o estresse da congelação, incluindo a célula espermática (SANGEETA *et al.*, 2015). Assim, essa proteção pode contribuir para manter a integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides, durante a criopreservação (SANGEETA *et al.*, 2015; UGUR *et al.*, 2020).

Alguns aminoácidos, como a glutamina e a glicina, são formados em quantidade substancial de glicose dentro dos túbulos seminíferos (BUSTAMANTE e SETCHELL, 2000). O fluido da rete testis tem 17 vezes mais aminoácidos do que o dos túbulos seminíferos, sendo que o glutamato contribui com 90% dos AAs totais no epidídimo (HINTON, 1990).

Vários aminoácidos foram detectados, no plasma seminal, e utilizados com sucesso como agentes crioprotetores não penetrantes, na criopreservação de espermatozoides de mamíferos. Como exemplo dos AAs estudados tem a glutamina e a prolina (DAVOODIAN *et al.*, 2017; SANGEETA *et al.*, 2015), a metionina (ÇOYAN *et al.*, 2010), a betaína (ATTIA *et al.*, 2019), a cisteína (EL-SHESHTAWY *et al.*, 2008), a alanina e a glicina (FAGUNDES *et al.*, 2010).

A capacidade dos AAs em melhorar a crio-sobrevivência dos espermatozoides tem sido relacionada com suas propriedades metabólicas e crioprotetoras, oxidantes ou osmorregulativas (MARTINS-BESSA *et al.*, 2007). Uma vez que os AAs não podem penetrar a membrana do espermatozoide, os mecanismos osmóticos podem explicar, em parte, a sua ação (SANGEETA *et al.*, 2015). Apesar de ter sido verificado o efeito crioprotetor sobre espermatozoides, em diversas espécies, os mecanismos de crioproteção espermática, conferidos pelos AAs, assim como a função de aminoácidos livres na fisiologia do espermatozoide, ainda não foram totalmente esclarecidos (FAGUNDES *et al.*, 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eficiência na criopreservação do sêmen suíno pode elevar a produtividade do rebanho através do melhoramento genético, auxiliar as medidas de biossegurança pela minimização da transmissão de patógenos, estimular o intercâmbio internacional de material

genético, facilitar a tecnologia da seleção de sexo, e permitir a formação de banco de germoplasma.

No entanto, quando os espermatozoides de suíno são expostos à variação de temperatura, durante a curva de congelamento, a membrana plasmática dessas células passa por modificações estruturais irreversíveis, que supostamente contribuem para a baixa fertilidade do sêmen suíno congelado/descongelado. Dessa forma, esses danos, na membrana plasmática, podem ser minimizados pela combinação da adição de aminoácidos ao diluente de congelamento, com a incorporação do colesterol, carregado com a ciclodextrina. O que se apresenta como método promissor para aumentar a resistência dos espermatozoides nas variações de temperatura, aumentando a viabilidade, as taxas de sobrevivência, a longevidade e a qualidade dos parâmetros espermáticos do sêmen, após a descongelamento.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, v.122, p.497-506, 2001.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.105-113, 2005.
- ANDRADE, A.F.C.; PEDROSA, A.C.; PASSARELLI, M.S.; MARTINS, S.M.M.K. Protocolos e possibilidades de criopreservação de sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.43, n.2, p.89-96, 2019.
- ARAÚJO, L.R.S.; BARROS, T.B.; GUIMARÃES, D.B.; CANTANHÊDE, L.F.; DIAS, A.A.; TONIOLLI, R. Uso de diluentes e temperaturas alternativas na conservação prolongada do sêmen do varrão. *Ciência Animal Brasileira*, v.17, n.1, p.26-35, 2016.
- ATTIA, Y.A.; EL-NAGGAR, A.S.; ABOU-SHEHEMA, B.M.; ABDELLA, A.A. Effect of Supplementation with Trimethylglycine (Betaine) and/or Vitamins on Semen Quality, Fertility, Antioxidant Status, DNA Repair and Welfare of Roosters Exposed to Chronic Heat Stress. *Animals*, v.9, p.1-15, 2019.
- BENNERMANN, P.E.; BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; CARDOSO, M.R.I. Motilidade espermática e integridade acrossomal em doses de sêmen suíno refrigeradas e inoculadas com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. *Ciência Rural*, v.30, p.313-318, 2000.
- BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*, v.70, n.3, p.708-717, 2004.
- BERNECIC, N.C.; ZHANG, M.; GADELLA, B.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; JANSEN, J.W.A.; ARKESTEIJN, G.J.A.; GRAAF, S.P.; LEAHY, T. BODIPY-cholesterol can be reliably used to monitor cholesterol efflux from capacitating mammalian spermatozoa. *Scientific Reports*, v.9, p.1-12, 2019.

- BOERKE, A.; TSAI, P.S.; GARCIA-GIL, N.; BREWIS, I.A.; GADELLA, B.M. Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology*, v.70, p.1188–1196, 2008.
- BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRA, F.M.; BORCHARDT NETO, G. Inseminação artificial na suinocultura tecnificada. 1ª ed., Porto Alegre: Pallotti, 2005. 185p.
- BUSTAMANTE, C.L.; SETCHELL, B.P. The uptake of amino acids, in particular Leucine, by isolated perfused testes of rats. *Journal of Andrology*, v.21, p.452-463, 2000.
- CALDERAM, I.B.K.; MASCHIO, É.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; RAMBO, G.; CORRÊA, É.K.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Inseminação artificial intra-uterina em leitoas com sêmen criopreservado com dimetilacetamida e glicerol. *Ciência Rural*, v.38, p.1978-1983, 2008.
- CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, p.67-75, 2008.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; SURAI, P.; NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, v.58, n.1-2, p.99–111, 2000.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*, v.121, p.395-401, 2001.
- CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, v.6, supl.2, p.329-357, 2005.
- CHUAYCHU-NOO, N.; THANANURAK, P.; CHANKITISAKUL, V.; VONGPRALU, T. Supplementing rooster sperm with Cholesterol-Loaded-Cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. *Cryobiology*, v.74, p.8-12, 2017.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 3ª ed., Belo Horizonte: CBRA; 2013. 104p.
- COOPER GM. The cell: a molecular approach. Washington: ASM Press, 1996. 673p.
- CORCINI, C.D.; VARELA, A.S.; PIGOZZO, R.; RAMBO, G.; GOULARTE, K.L. Pre-freezing and post thawing quality of boar sperm for distinct portions of the ejaculate and as a function of protein bands present in seminal plasma. *Livestock Science*, v.145, n.1, p.28-33, 2012.
- CÓRDOVA-IZQUIERDO, A.; OLIVA, J.H.; LLEÓ, B.; GARCÍA-ARTIGA, C.; CORCUERA, B.D.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J.F. Effect of diferente thawing temperatures on the viability, in vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 mL straws. *Animal Reproduction Science*, v.92, p.145–154, 2006.
- ÇOYAN, K.; BASPINAR, N.; BUCAK, M.N.; AKALIN, P.P; ATAMAN, M.B.; ÖMÜR, A.D.; GÜNGÖR, S.; KÜÇÜKGÜNAY, S.; ÖZKALP, B.; SARIÖZKAN, S. Influence of

methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Research in Veterinary Science*. v.89, p.426–431, 2010.

DAVIS, B.K. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. *Archive of Andrology*, v.5, p.249-254, 1980.

DAVOODIAN, N.; KADIVA, A.; AHMADI, E.; MOHEBBI, A. Effects of Two Amino Acids on Motion Parameters and Enzymatic Antioxidant Activity of Freeze-Thawed Stallion Spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.59, p.49-56, 2017.

DZIEKOŃSKA, A., KINDER, M., FRASER, L., STRZEŻEK, J.; KORDAN, W. Metabolic activity of boar semen stored in different extenders supplemented with ostrich egg yolk lipoproteins. *Journal of Veterinary Research*, v.61, n.1, p.127-133, 2017.

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Ed.). *The Physiology of Reproduction*. 2^a ed., New York: Raven Press, p.29-77, 1994.

EL-SHESHTAWY, R.I.; EL-SISY, G.A.; EL-NATTAT, W.S. Use of selects aminoacids to improve buffalo bull semen cryopreservation. *Global Veterinária*, v.2, p.146-150, 2008.

FAGUNDES, B.; SILVA, J.F.S.; SHIMOYA, A.; CUNHA, I.C.N.; SOUZA, G.V.; TILBURG, M.F. Adição de alanina, glicina e glutamina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, n.2, p.279-284, 2010.

FAHY, G.M. Analysis of “solution effects” injury. Equations for calculating phase diagram information of the ternary system NaCl-dimethylsulfoxide-water and NaCl-glycerol-water. *Biophysical Journal*, v.32, p.837-850, 1980.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *European Journal of Wildlife Research*, v.53, p.81-89, 2007.

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

GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B.; CANTANHÊDE, L.F. FEUGANG, J.M.; SOUZA, L.P.; TONIOLLI, R. Qualidade espermática durante a curva de resfriamento do sêmen suíno diluído em água de coco e pó visando sua criopreservação. *Ciência Animal Brasileira*, v.19, p.1-16, 2018.

HAMDI, S.M.; VIEITEZ, G.; JASPARD, B.; BARBARAS, R.; PERRET, B.; MIEUSSET, R.; PARINAUD, J.; COLLET, X. Effects of human follicular fluid and high-density lipoproteins on early spermatozoa hyperactivation and cholesterol efflux. *Journal of Lipid Research*, v.51, n.6, p.1363-1369, 2010.

HE, Y.; LI, D.; ZHANG, W.; TIAN, X.; PANG, W.; DU, R.; YANG, G.; YU, T. Boar sperm quality and oxidative status as affected by rosmarinic acid at 17 °C. *Tropical Animal Health and Production*, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02246-1>

HINTON, B.T. The testicular and epididymal luminal amino acids microenvironment in the rat. *Journal of Andrology*, v.11, p.498-505, 1990.

HIWASA, M.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; OKABE, K.; FUKUI, Y. Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, v.55, n.1, p.50-54, 2009.

HOLT, W.V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L.M.; WATSON, P.F. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.370–382, 2005.

HOUPALATHI, R.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ANTON, M. *Bioactive egg compounds*. 1^a ed., New York: Springer Verlag, 2007. 296p.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.143-172, 2000.

KASHIWAZAKI, N.; OKUDA, Y.; SEITA, Y.; HISAMATSU, S.; SONOKI, S.; SHINO, M.; MASAOKA, T.; INOMATA, T. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. *Journal of Reproduction and Development*, v.52, p.511-516, 2006.

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

LEE, Y.S.; LEE, S.; LEE, S.H.; YANG, B.K.; PARK, C.K. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.159, p.124-130, 2015.

LIMA, A.S., BITTENCOURT, R.F., RIBEIRO FILHO, A.L., LOIOLA, M.V.G., MENEZES, G.F.O., BARRETO, R.O., VASCONCELOS, I.C., SILVA, C.C., JESUS, E.O., SNOECK, P.P.N. Utilização da lipoproteína de baixa densidade, em diferentes concentrações, em meio diluidor para criopreservação do sêmen ovino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.71, n.6, p.1889-1895, 2019.

LONE, S.A.; PRASAD, J.K.; GHOSH, S.K.; DAS, G.K.; BALAMURUGAN, B.; KATIYAR, R.; VERMA, M.R. Effect of incubation on freezability of cholesterol-loaded cyclodextrin treated buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. *Veterinary World*, v.9, p.182-185, 2016.

LONE, S.A. Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action on sperm during cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, v.192, p.1-5, 2018.

LÓPEZ-SALGUERO, J.B.; FIERRO, R.; MICHALSKI, J.-C.; JIMÉNEZ-MORALES, I.; LEFEBVRE, T.; MONDRAGÓN-PAYNE, O.; BALDINI, S.F.; VERCOUTTER-EDOUART, A.-S.; GONZÁLEZ-MÁRQUEZ, H. Identification of lipid raft glycoproteins obtained from boar spermatozoa. *Glycoconjugate Journal*, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09924-0>

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.; MAYENCO-AGUIRRE, A. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. *Theriogenology*, v.68, p.1088–1096, 2007.

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

MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J.K. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: presente moment and perspectives to future. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, n.2, p.57-66, 2010a.

MOCÉ, E.; PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, v.118, p.236-247, 2010b.

MORAES, E.A.; MATOS W.C.G.; GRAHAM, J.K.; FERRARI JUNIOR, W.D. Cholestanol-loaded-cyclodextrin improve the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. v.158, p.19-24, 2015.

NEVES, M.M.; HENRY, M. Gema do ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.36, n.4, p.209-214, 2012.

NIKOLOPOULOU, M.; SOUCEK, D.A.; VARY, J.C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.815, p.486-498, 1985.

NUNES, J.F. Inseminação artificial em caprinos. In: GONSALVEZ, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela, 2002. p.111-125.

OLIVEIRA, E.C.S.; JULIANI, G.C.; MARQUES JR, A.P.; HENRY, M. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, p.1116-1122, 2006.

PINART, E.; YESTE, M.; PRIETO-MARTÍNEZ, N.; REIXACH, J.; BONET, S. Sperm quality and fertility of boar seminal doses after 2 days of storage: Does the type of extender really matter? *Theriogenology*, v.83, p.1428-1437, 2015.

PRIETO-MARTÍNEZ, N.; VILAGRAN, I.; MORATÓ, R.; ÁLAMO, M.M.R.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; BONET, S.; YESTE, .M. Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze-thawing procedures. *Andrology*, v.5, n.6, p.1153-1164, 2017.

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

PYLES, E. Criopreservação de embriões e oócitos. *Bio Embryo*; 2013. Acesso em 19 agosto de 2019. Disponível em: <http://www.bioembryo.com.br/noticias.php?cat=1&subcat=2&id=188>>

RAJORIYA, J.S.; PRASAD, J.K.; RAMTEKE, S.S.; PERUMAL, P.; GHOSH, S.K.; SINGH, M.; PANDE, M.; SRIVASTAVA, N. Enriching membrane cholesterol improves stability and cryosurvival of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.164, p.72-81, 2016.

RANA, A.P.; MAJUMDER, G.C.; MISRA, S.; GHOSH, A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1061, p.185-196, 1991.

REJRAJI, H.; SION, B.; PRENSIER, G.; CARRERAS, M.; MOTTA, C.; FRENOUX, J.M.; VERICEL, E.; GRIZARD, G.; VERNET, P.; DREVET, J.R. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biology of Reproduction*, v.74, p.1104-1113, 2006.

ROCHA, L.G.P.; ZANGERONIMO, M.G.; MURGAS, L.D.S.; OBERLENDER, G.; PEREIRA1, L.J.; PEREIRA, B.A.; CHAVES, B.R.; SILVA, D.M. Evaluation of two different boar semen freezing protocols and their effects on semen quality after thawing. *Animal Reproduction*, v.12, n.4, p.871-875, 2015.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reproduction in Domestic Animals*, v.38, n.4, p.312-318, 2003.

RODRIGUES-MARTINEZ H, LARSSON B, PERTOFT H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reproduction, Fertility and Development*, v.9, p.297-308, 1997.

SAEZ, F.; OUVRIER, A.; DREVET, J.R. Epididymis cholesterol homeostasis and sperm fertilizing ability. *Asian Journal of Andrology*, v.13, p.11-17, 2011.

SALMON, V.M.; CASTONGUAY, F.; DEMERS-CARON, V.; LECLERC P.; BAILEY, J.L. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryoresistance in skim milk-extender. *Animal Reproduction Science*, v.177, p.1-11, 2017.

SANCHEZ, S.A.; GUNTHER, G.; TRICERRI, M.A.; GRATTON, E. Methyl-bcyclodextrins preferentially remove cholesterol from the liquid disordered phase in giant unilamellar vesicles. *Journal of Membrane Biology*, v.241, p.1-10, 2011.

SANGEETA, S.; ARANGASAMY, A.; KULKARNI, S.; SELVARAJU, S. Role of amino acids as additives on sperm motility, plasma membrane integrity and lipid peroxidation levels at pre-freeze and post-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.161, p.82-88, 2015.

SARAVIA, F, WALLGREN M, NAGY S, JOHANNISSON A, RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ H. Deep freezing of concentrated boar semen for intrauterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology*, v.63, n.5, p.1320-1333, 2005.

SARTORI, A.; BECHARA, E.J.H. Metilglioxal: uma toxina endógena? *Química Nova*, v.33, n.10, p.2193-2201, 2010.

SHI, J.; LI, Y.; REN, K.; XIE, Y.; YIN, W.; MO, Z. Characterization of cholesterol metabolism in Sertoli cells and spermatogenesis (Review). *Molecular Medicine Reports*, v.17, n.1, p.705-713, 2018.

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

SNOECK, P.P.N. Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade. 2003. 116p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

SNOECK, P.P.N. Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade. 2003. 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2003.

SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; COSTA, J.M.S; GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrin in fresh goat sperm improves cryosurvival rates. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v.23, n.1/1, p.93-98, 2016.

SOUZA, W.L.; MORAES, E.A.; OLIVEIRA, R.P. Colesterol carregado pela ciclodextrina sobre a criopreservação dos espermatozoides de garanhões da raça Nordestina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.38, n.5, p.991-996, 2018.

TAVILANI, H.; GOODARZI, M.T.; DOOSTI, M.; VAISI-RAYGANI, A.; HASSANZADEH, T. Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. *Reproductive Biomedicine Online*, v.16, n.5, p.649-656, 2008.

THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, v.65, p.1531-1550, 2006.

TONHATI, R. L-prolina no alívio do estresse térmico em tomateiro cultivado em ambiente protegido. 2018. 76p. Tese (Doutorado). 2018. DOI:10.11606/D.11.2019.tde-20032019-120556

TONIOLLI, R.; BARROS, T.B., TONIOLLI, L.S.2, GUIMARÃES, D.B., DIAS, A.V.; CANTANHÊDE, L.F.; ARAÚJO, L.R.S.; FILHO, I.B.Q. Qualidade espermática do ejaculado suíno conservado a 5 °C no diluente ACP-103[®] associado à gema de ovo. *Ciência Animal* v.23, n.2, p.45-57, 2013.

TONIOLLI, R.; GUIMARÃES, D.B.; BARROS, T.B. Proteínas do sêmen e sua relação com a resistência à congelação em ejaculados de diferentes varrões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.41, p.297-311, 2017.

UGUR, M.R.; DINH, T.; HITIT, M.; KAYA, A.; TOPPER, E.; DIDION, B.; MEMILI, E. Amino acids of seminal Plasma associated with freezability of bull sperm. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v.7, p.1-14, 2020.

VALENTE, S.S.; PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. *Animal Reproduction Science*, v.117, n.1-2, p.74-77, 2010.

VICENTE-CARRILLO, A., EKWALL, H., ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Membrane Stress During Thawing Elicits Redistribution of Aquaporin 7 But Not of Aquaporin 9 in Boar Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v.51, n5, p.665–679, 2016.

WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; GLEUMES, T.; SCHWARZ, M.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology*, v.42, p.831-840, 1994.

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

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60/61, p.481-492, 2000.

WONGTAWAN, T.; SARAIVA, F.; WALLGREN, M.; CABALLERO, I.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology*, v.65, p.773–787, 2006.

YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, v.14, n.1, p.69-81, 2017.

YESTE, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; BONET, S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Molecular Reproduction Development*, v.84, n.9, p.802-813, 2017.

ZAJA, I.Z.; SAMARDZIJA, M.; VINCE, S.; VILIĆ, M.; MAJIC-BALIĆ, I.; DURICIĆ, D.; MILINKOVIĆ-TUR, S. Differences in seminal plasma and spermatozoa antioxidative systems and seminal plasma lipid and protein levels among boar breeds and hybrid genetic traits. *Animal Reproduction Science*, v.170, p.75-82, 2016.