

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**ESTUDOS DE DIFERENTES PROTOCOLOS
UTILIZANDO LIPOPROTEINAS DE BAIXA
DENSIDADE NA CRIOPRESERVAÇÃO
DO SEMEN EQUINO**

Geraldo César Juliani Santos

Belo Horizonte

2007

Geraldo César Juliani Santos

**ESTUDOS DE DIFERENTES PROTOCOLOS UTILIZANDO LIPOPROTEINAS DE
BAIXA DENSIDADE NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SEMEN EQUINO**

Trabalho de conclusão apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Curso: Ciência Animal

Área: Reprodução animal

Orientador: Prof. Dr. Marc Roger Jean Marie Henry

Belo Horizonte

2007

S237e Santos, Geraldo César Juliani, 1964-
Estudo de diferentes protocolos utilizando lipoproteínas de baixa densidade na
criopreservação do sêmen equino / Geraldo César Juliani Santos. – 2007.
81 p. : il.

Orientador: Marc Roger Jean Marie Henry
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

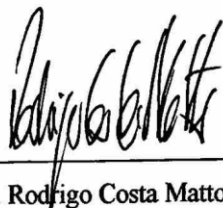
1. Equino – Reprodução – Teses. 2. Equino – Espermatozoides – Teses. 3. Sêmen -
Criopreservação – Teses. 4. Lipoproteínas – Teses. 5. Reprodução animal – Teses.
I. Henry, Marc Roger Jean Marie. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de
Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 926

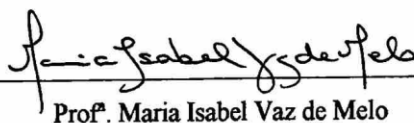
Tese defendida e aprovada em 27 de julho de 2007, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Marc Roger Jean Marie Henry
(Orientador)



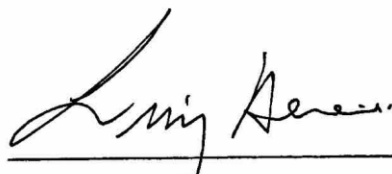
Prof. Rodrigo Costa Mattos



Prof.ª Maria Isabel Vaz de Melo



Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho



Dr. Luis Guilherme Dias Hereine

SUMÁRIO

	RESUMO	10
	ABSTRACT	11
1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	EXPERIMENTO I – Efeito das lipoproteínas de baixa densidade sobre diferentes crioprotetores e curvas de congelamento sobre os espermatozóides eqüinos criopreservados	18
	RESUMO	18
	ABSTRACT	19
2.1	OBJETIVO	19
2.2	JUSTIFICATIVA	20
2.3	MATERIAL E MÉTODOS	21
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
2.5	CONCLUSÕES	47
	ANEXOS	48
3	EXPERIMENTO II - Efeito da forma de adição da dimetilformamida e da variação de osmolaridade do meio diluidor base sobre a viabilidade dos espermatozóides eqüinos criopreservados	54
3.1	OBJETIVO	54
3.2	JUSTIFICATIVA	54
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	56
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.5	CONCLUSÕES	66
	ANEXOS	67
4	CONSIDERAÇÕES GERAIS	69
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE TABELAS

EXPERIMENTO I

Tabela 1.1: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.2: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.3: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento para as 1 e 2 em conjunto

Tabela 1.4: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, do sêmen de sete garanhões obtidos pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2

Tabela 1.5: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de sete garanhões obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.6: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de sete garanhões obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.7: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de sete garanhões obtidas pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2

Tabela 1.8: Valores médios de morfologia, do sêmen de sete garanhões obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.9: Valores médios de morfologia, do sêmen de sete garanhões obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.10: Valores médios de morfologia espermática do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2

Tabela 1.11: Valores médios de morfologia espermática do sêmen de sete garanhões, obtida pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.12: Valores médios de morfologia espermática do sêmen de sete garanhões, obtida pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.13: Valores médios de morfologia espermática do sêmen de sete garanhões, obtido pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2

Tabela 1.14: Valores médios de morfologia espermática do sêmen de sete garanhões, obtido pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2

Tabela 1.15: Valores médios do teste hiposmótico do sêmen de sete garanhões, obtido pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2

Tabela 1.16: Valores médios do teste hiposmótico (HO), do sêmen de sete garanhões, obtido pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.17: Valores médios do teste hiposmótico (HO), do sêmen de sete garanhões, obtido pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.18: Valores médios do teste hiposmótico do sêmen de sete garanhões, obtido pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2

Tabela 1.19: Valores médios de teste hiposmótico (HO) do sêmen de sete garanhões, obtido pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.20: Valores médios de teste hiposmótico (HO) do sêmen de sete garanhões, obtido pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.21: Valores médios do teste hiposmótico do sêmen de sete garanhões, obtido pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2

Tabela 1.22: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.23: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.24: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de sete garanhões obtidos pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2

Tabela 1.25: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.26: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.27: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de sete garanhões obtidos pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2

Tabela 1.28: Porcentagem de espermatozoides íntegros do sêmen de sete garanhões obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2 quando realizado o desdobramento de porcentagem de LBD dentro dos crioprotetores e de crioprotetores dentro das porcentagens de LBD

Tabela 1.29: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de sete garanhões obtidos pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2

Tabela 1.30: Percentual de espermatozoides lesados do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado a análise em conjunto das curvas de congelamento 1 e 2 e o desdobramento de crioprotetor dentro de curvas e de curvas dentro do crioprotetor

Tabela 1.31: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, do sêmen de sete garanhões, obtidos pelo teste de termo resistência, pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.32: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, pelo teste de termo resistência, do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.33: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, pelo teste de termo resistência, do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.34: Valores médios de motilidade total pelo teste de termo resistência, do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1 quando realizado o desdobramento de crioprotetor dentro de tempo e vice versa

Tabela 1.35: Valores médios de motilidade progressiva pelo teste de termo resistência, do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1 quando realizado o desdobramento de crioprotetor dentro de tempo e vice versa

Tabela 1.36: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, do sêmen de sete garanhões, obtidos pelo teste de termo resistência, pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.37: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, do sêmen de sete garanhões, obtidos pelo teste de termo resistência, pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.38: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, pelo teste de termo resistência, do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.39: Valores médios de motilidade total pelo teste de termo resistência, do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2 quando realizado o desdobraimento de crioprotetor dentro de tempo e vice versa

Tabela 1.40: Valores médios de motilidade progressiva pelo teste de termo resistência, do sêmen de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2 quando realizado o desdobraimento de crioprotetor dentro de tempo e vice versa.

EXPERIMENTO II

Tabela 2.1: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes substâncias

Tabela 2.2: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas formas de adição da dimetilformamida

Tabela 2.3: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas Osmolaridades diferentes

Tabela 2.4: Valores médios de motilidade total, do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado o desdobraimento dos valores para substâncias dentro de Osmolaridade e vice versa.

Tabela 2.5: Valores médios de motilidade total, do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado o desdobraimento dos valores para substâncias dentro de formas de adição da dimetilformamida e vice versa.

Tabela 2.6: Valores médios de motilidade progressiva, do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado o desdobraimento dos valores para substâncias dentro de osmolaridade (mOsmol/L) e vice versa.

Tabela 2.7: Valores médios de motilidade progressiva, do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado o desdobraimento dos valores para substâncias dentro de formas de adição da dimetilformamida e vice versa.

Tabela 2.8: Valores médios de morfologia espermática do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para dois meios diferentes.

Tabela 2.9: Valores médios de morfologia espermática do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes osmolaridades (mOsmol/L).

Tabela 2.10: Valores médios de morfologia espermática do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes formas de adição da dimetilformamida.

Tabela 2.11: Valores médios de teste hiposmótico do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes substâncias.

Tabela 2.12: Valores médios de teste hiposmótico do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes osmolaridades

Tabela 2.13: Valores médios de teste hiposmótico do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes formas de adição da dimetilformamida.

Tabela 2.14: Valores médios de teste hiposmótico do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado o desdobraimento dos valores para substâncias dentro de Osmolaridade (mOsmol/L) e vice versa..

Tabela 2.15: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes substâncias.

Tabela 2.16: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes osmolaridades (mOsmol/L).

Tabela 2.17: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes formas de adição da dimetilformamida.

LISTA DE ANEXOS

EXPERIMENTO I

Tabela 1.1A: Análise de variância para Motilidade Total, Motilidade Progressiva e Vigor espermático obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.2A: Análise de variância para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático obtido pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.3A: Análise de variância para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático obtida em conjunto para as curvas 1 e 2

Tabela 1.4A: Análise de variância para Morfologia obtida pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.5A: Análise de variância para Morfologia obtida pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.6A: Análise de variância para Morfologia pós-descongelamento obtida em conjunto para as curvas 1 e 2.

Tabela 1.7A: Análise de variância para teste hiposmótico obtido pós-descongelamento utilizando a curva 1

Tabela 1.8A: Análise de variância para teste hiposmótico obtido pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tabela 1.9A: Análise de variância para teste hiposmótico pós-descongelamento obtida em conjunto para as curvas 1 e 2

Tabela 1.10A: Análise de variância para íntegros, semilesados e lesados obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1.

Tabela 1.11A: Análise de variância para íntegros, semilesados e lesados obtida pós-descongelamento utilizando a curva 2.

Tabela 1.12A: Análise de variância para íntegros, semilesados e lesados obtida pós-descongelamento em conjunto para as curvas 1 e 2.

Tabela 1.13A: Análise de variância para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático utilizando curva 1.

Tabela 1.14A: Análise de variância para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático utilizando a curva 2.

Tabela 1.15A: Composição do Meio diluidor INRA 82 modificado.

Tabela 1.16A: Osmolaridade e pH final dos meios diluidores de sêmen de garanhão.

EXPERIMENTO II

Tabela 2.1A: Análise de variância para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático.

Tabela 2.2A: Análise de variância para morfologia espermática

Tabela 2.3A: Análise de variância para teste hiposmótico (HO)

Tabela 2.4A: Análise de variância para íntegros, semilesados e lesados.

Tabela 2.5A: Osmolaridade e pH final dos meios diluidores de sêmen de seis garanhões

RESUMO

Os protocolos de congelamento de sêmen equino não são padronizados e com isso o sucesso dessa técnica varia substancialmente. O Experimento 1 teve como objetivo determinar se a substituição da gema de ovo total pela fração de lipoproteínas de baixa densidade do ovo no diluidor exerce um efeito crioprotetor mais eficaz sobre a célula espermática equina e qual a concentração mais indicada. O Experimento 2 buscou-se avaliar a forma de adição da dimetilformamida nos diluidores testados no Experimento 1, bem como o efeito da osmolaridade do meio base sobre a qualidade espermática após o descongelamento. Para o Experimento 1, os ejaculados de 7 garanhões foram congelados em duas curvas de congelamento, uma rápida (palhetas mantidas a 3 cm do nível do nitrogênio líquido, durante 15 minutos) e uma lenta (queda de 0,5°C/min. até 5,0°C, e queda de 20°C/min. até -120°C, obtida em máquina computadorizada, Modelo TK 2000 – TETAKON – NUTRICELL); utilizando dois crioprotetores, glicerol ou dimetilformamida em diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade. Foram testados: **T1**: INRA 82, com 5% de glicerol (controle), **T2**: INRA 82, com 5% de glicerol e 5% de LBD, **T3**: INRA 82, com 5% de glicerol e 10% de LBD, **T4**: INRA 82, com 5% de glicerol e 20% de LBD, **T5**: INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 5% de LBD, **T6**: INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 10% de LBD, **T7**: INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 20% de LBD, **T8**: INRA 82, com 5% de dimetilformamida (controle). Para o Experimento 2, seis ejaculados foram congelados nos seguintes diluidores testados: **D1**: INRA 82, com 20% de LBD a 300mOsmol/L e 5% de DMF; **D2**: INRA 82, com 20% de LBD a 400mOsmol/L e 5% de DMF; **D3**: INRA 82, com 2% de gema ovo a 300mOsmol/L e 5% de DMF; **D4**: INRA 82, com 2% de gema ovo a 400mOsmol/L e 5% de DMF. Nesse caso os 4 diluidores testados foram feitos em duplicata, tendo sido adicionada a dimetilformamida em fração única ou fracionada ao longo do tempo. Em ambos experimentos o descongelamento foi feito a 52°C por 10 segundos, seguidos de imersão em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Após o descongelamento foram avaliados os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático em microscopia óptica. Foram avaliadas as integridades funcionais e estruturais dos espermatozoides através dos testes hiposmótico e de fluorescência respectivamente. Os espermatozoides foram submetidos ao teste de termo resistência. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, com delineamento de blocos ao acaso, e comparação entre médias por Teste Tukey. No Experimento 1, as lipoproteínas de baixa densidade, utilizadas nas concentrações de 10 e 20% mostraram ser tão eficientes em proteger os espermatozoides quanto a gema de ovo integral usada no INRA 82. A curva lenta foi superior a curva rápida para os parâmetros motilidade total, motilidade progressiva, vigor espermático, teste hiposmótico e teste de termo resistência, independente do crioprotetor utilizado. A dimetilformamida foi superior ao glicerol, nas duas curvas de congelamento, nas avaliações de motilidade total, motilidade progressiva, morfologia espermática, teste hiposmótico, número de espermatozoides lesados e teste de termo resistência. Para o Experimento 2, todos os parâmetros avaliados de viabilidade dos espermatozoides equinos criopreservados, exceto motilidade, foram aumentados pela adição fracionada de dimetilformamida juntamente com o uso de maior osmolaridade inicial do meio base.

Palavras-chave: equino, criopreservação, lipoproteína de baixa densidade, dimetilformamida, osmolaridade

ABSTRACT

Equine semen freeze protocols are not standardized and thus the success of this technique varies substantially. Experiment 1 aimed to determine if the substitution of the total egg yolk for the low density lipoprotein fraction of the egg in the diluent exerts a more effective cryoprotective effect on the equine sperm cell and what concentration is indicated. Experiment 2 sought to evaluate the addition of dimethylformamide in the diluents tested in Experiment 1, as well as the effect of base media osmolarity on sperm quality after thawing. For Experiment 1, the ejaculates of 7 stallions were frozen in two freezing curves, one rapid (reeds kept 3 cm from the liquid nitrogen level for 15 minutes) and one slow (falling from 0.5 ° C / min to 5, 0oC, and fall of 20oC / min up to -120oC, obtained in computerized machine, Model TK 2000 - TETAKON - NUTRICELL); Using two cryoprotectants, glycerol or dimethylformamide at different concentrations of low density lipoproteins. The results of the study were: T1: INRA 82, with 5% glycerol (control), T2: INRA 82, 5% glycerol and 5% LBD, T3: INRA 82, 5% glycerol and 10% LBD, T4: INRA 82, 5% glycerol and 20% LBD, T5: INRA 82, 5% dimethylformamide and 5% LBD, T6: INRA 82, 5% dimethylformamide and 10% LBD, T7: INRA 82, 5% dimethylformamide and 20% LBD, T8: INRA 82, with 5% dimethylformamide (control). For Experiment 2, six ejaculates were frozen in the following diluents tested: D1: INRA 82, with 20% LBD at 300 mOsmol / L and 5% DMF; D2: INRA 82, with 20% LBD at 400mOsmol / L and 5% DMF; D3: INRA 82, with 2% egg yolk at 300 mOsmol / L and 5% DMF; D4: INRA 82, with 2% egg yolk at 400mOsmol / L and 5% DMF. In this case the 4 diluents tested were made in duplicate, with dimethylformamide being added in single or fractional fraction over time. In both experiments the thawing was done at 52oC for 10 seconds, followed by immersion in a water bath at 37oC for 30 seconds. After thawing, the parameters of total motility, progressive motility and sperm vigor in light microscopy were evaluated. Functional and structural integrity of the spermatozoa were evaluated through hyposmotic and fluorescence tests, respectively. The spermatozoa were submitted to the endurance test. Statistical analysis was performed using ANOVA, with a randomized block design, and comparison between means by Tukey Test. In Experiment 1, low-density lipoproteins used at concentrations of 10 and 20% were shown to be as efficient in protecting the spermatozoa as in the whole egg yolk used in INRA 82. The slow curve was superior to the rapid curve for the parameters total motility, progressive motility, spermatid vigor, hyposmotic test and thermo resistance test, independent of the cryoprotectant used. Dimethylformamide was superior to glycerol in the two freezing curves, in evaluations of total motility, progressive motility, sperm morphology, hyposmotic test, number of spermatozoa injured and endurance test. For Experiment 2, all viability parameters of cryopreserved equine spermatozoa except motility were increased by the fractionated addition of dimethylformamide together with the use of higher initial osmolarity of the base medium.

Key-words: equine, cryopreservation, low density lipoprotein, dimethylformamide, osmolarity

1. INTRODUÇÃO GERAL

Completados cinquenta anos da primeira prenhez obtida pós-inseminação artificial com sêmen congelado eqüino (Barker & Gandier, 1957), quando espermatozoides recuperados do epidídimo foram congelados em meio diluidor à base de leite contendo 10% de glicerol, os protocolos atuais de congelamento desenvolvidos para a espécie eqüina não foram ainda capazes de produzir sêmen congelado que resultasse em taxas de prenhez satisfatórias (Parks & Graham, 1992).

Diversas publicações (Amann & Pickett, 1987; Pickett & Amann, 1993; Graham, 1996; Loomis, 2001) relatam as vantagens e desvantagens da utilização do sêmen congelado eqüino. Dentre as diversas vantagens podemos citar: a possibilidade de utilização de garanhões na reprodução durante os períodos de competição ou mesmo se acometidos por doenças, o que permite a utilização internacional do garanhão, e aumenta o uso de reprodutores geneticamente superiores; facilidade de remessa e armazenamento de sêmen nos haras até o momento adequado para sua utilização, aumentando assim o número de éguas passíveis de serem inseminadas por determinado reprodutor; diminuição da incidência de doenças sexualmente transmissíveis, possibilidade de utilização do reprodutor zootecnicamente superior mesmo após sua morte. No entanto, um dado importante e preocupante é a unanimidade entre estas publicações ao relatarem o baixo índice de fertilidade como a principal desvantagem da utilização do sêmen congelado eqüino.

Mas qual a razão dos baixos índices de fertilidade com o sêmen congelado eqüino? Por que, mesmo com toda a evolução tecnológica, não foi ainda possível alcançar índices de fertilidade satisfatórios para o sêmen congelado eqüino? Responder essas questões vem sendo objetivo de vários pesquisadores e diferentes grupos de pesquisas em vários países do mundo. Mas antes de responder essas questões precisamos ainda responder outras, igualmente importantes, para encontrarmos respostas a nossas primeiras perguntas, como, por exemplo, quais são precisamente os efeitos do congelamento sobre a fertilidade? Como se comportam as células espermáticas durante o processo de congelamento? Quais são as alterações estruturais e funcionais que essas células sofrem? Como proteger os espermatozoides desses efeitos? Por que ainda não foi encontrado um protocolo de congelamento que atenda especificamente a espécie eqüina? Para tentar responder a todas essas questões, alguns aspectos precisam ser considerados e bem compreendidos.

Em primeiro lugar, durante os processos de espermatogênese, maturação epididimária e a maturação final provocada pelo contato dos espermatozoides com o plasma seminal, as células espermáticas passam por diversas modificações na sua estrutura biológica e adquirem certos atributos necessários para promoverem a fertilização. Segundo Amann & Pickett (1987), para que um espermatozoide possa fertilizar um ovócito, ele precisa desenvolver e manter pelo menos cinco atributos essenciais:

1. Metabolismo para a produção de energia;
2. Motilidade progressiva;
3. Enzimas, localizadas na cabeça do acrossoma, que são essenciais para a penetração dos espermatozoides através das estruturas ao redor do ovócito;
4. Lipídios distribuídos adequadamente nas membranas plasmática e acrossomal, para estabilização dessas estruturas até o processo de fertilização;

5. Proteínas da membrana plasmática que são essenciais para a sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo da fêmea.

Em segundo lugar, é preciso compreender como biologicamente os processos de congelamento e descongelamento alteram esses atributos essenciais. Sabemos que, para ocorrer a fertilização, o espermatozoide deve ser capaz de atravessar o cúmulus oóforos, penetrar a coroa radiata e a zona pelúcida antes de se fundir com o ovócito. Todo esse processo não requer somente motilidade e morfologia espermática normais, envolve também complicados eventos bioquímicos e morfológicos (Jeyendran & Zaneveld, 1993). Blottner et al. (2001) citam que a avaliação morfológica e a determinação da motilidade espermática pós descongelamento são somente indicações da capacidade de fertilização, onde a motilidade espermática pós descongelamento apresenta pouca correlação com fertilidade, indicando que lesões subcelulares poderiam afetar ou interferir na fertilidade sem, no entanto, afetar a motilidade espermática.

A melhoria na capacidade fecundante do sêmen congelado equino deve passar obrigatoriamente pela melhor preservação de todas as estruturas espermáticas e, conseqüentemente, de suas funções. A utilização de agentes crioprotetores tem como função minimizar ou impedir o desarranjo estrutural das membranas, preservando as funções dessas pós-descongelamento. Para a preservação de todas essas funções deve haver um perfeito equilíbrio entre os componentes dos meios diluidores, evitando ou minimizando as injúrias que os processos de congelamento e descongelamento sabidamente provocam nas células espermáticas.

Entre os vários crioprotetores utilizados para o congelamento de sêmen equino, o glicerol, descoberto por Polge e colaboradores em 1949 (Polge et al, 1949) continua sendo um dos mais utilizados (Amann & Pickett, 1987; Parks & Graham, 1992; Watson, 1995). Com o intuito de substituir o glicerol e aumentar a fertilidade do sêmen congelado equino, diferentes agentes crioprotetores têm sido intensamente estudados, destacando-se, entre eles, as amidas (Alvarenga et al., 2000; Vidament et al., 2002; Arruda et al., 2002; Snoeck et al., 2002; Medeiros et al., 2003; Alvarenga et al., 2004; Alvarenga et al., 2005., Carmo et al., 2005, Juliani & Henry, 2006, Osório et al., 2006). No entanto, apesar de toda a tecnologia empregada e dos avanços realmente obtidos, continua o glicerol, apesar de potencialmente tóxico para o espermatozoide equino, sendo, entre os agentes crioprotetores, o meio permeante mais aceito e utilizado (Demick et al., 1976; Cochran et al., 1983; Bedford et al., 1994; Jasko, 1994; Watson, 1995).

Buscando melhoria na preservação da integridade celular, a associação de agentes crioprotetores também tem sido amplamente utilizada por diversos pesquisadores nos meios de congelamento de sêmen equino, como por exemplo, a do glicerol à gema de ovo (Klug et al., 1975; Martin et al., 1979; Tischner, 1979; Cristanelli et al., 1984; Samper et al., 1991), ou ao leite desnatado (Papa et al., 2004). Ultimamente, além dessas associações, outros crioprotetores como o etilenoglicol, acetamida, formamida, dimetilformamida e diferentes moléculas como trealose, metilcelulose e rafinose têm sido incorporadas por diversos pesquisadores (Mercante et al., 1995; Neves Neto et al., 1995; Alvarenga et al., 2000; Cottorello, 2001; Henry et al., 2002; Juliani et al., 2003; Alvarenga et al., 2004; Carmo et al., 2005) nas associações de crioprotetores.

Dentre os diversos agentes crioprotetores estudados, a dimetilformamida tem-se mostrado como uma das alternativas com melhor potencial para melhorar a sobrevivência da célula espermática pós-descongelamento, em especial para aqueles ganhões que apresentam baixa congelabilidade

espermática (Alvarenga et al., 2000; Squires et al., 2004; Alvarenga et al., 2004; Carmo et al., 2005; Landim-Alvarenga et al., 2005).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa em criopreservação de sêmen equino tem focado a procura por agentes crioprotetores alternativos, particularmente os agentes permeantes, através de suas associações ou pelo uso puro dos mesmos. Desses estudos, ficou demonstrado existirem crioprotetores e associações de crioprotetores permeantes que podem ser usados como agentes crioprotetores alternativos para o sêmen congelado equino (Alvarenga et al., 2000; Cottorelo et al., 2001; Juliani et al., 2002; Snoeck et al., 2002; Henry et al., 2002; Juliani et al., 2003; Juliani et al., 2004; Juliani & Henry, 2006; Osório et al., 2006). No entanto, após quase sessenta anos da descoberta da capacidade crioprotetora do glicerol (Polge et al., 1949), os agentes e associações de agentes crioprotetores testados ainda não superaram, na sua totalidade, a capacidade crioprotetora do glicerol, sendo ainda um vasto campo a ser pesquisado.

Apesar das inúmeras modificações testadas nos meios diluidores, a melhoria expressa em ganhos de fertilidade do sêmen congelado ainda é discreta, deixando plenamente aberta e atual a necessidade de se aprimorar em não somente os meios diluidores como também as técnicas e os protocolos de congelamento e descongelamento de sêmen na espécie equina.

Diversos pesquisadores (Cochran et al., 1984; Graham, 1996; Vidament et al., 1997; Morris et al., 2000; Nie et al., 2002) relatam que, apesar das inúmeras pesquisas, não existe ainda um protocolo ideal de congelamento para a espécie equina, uma vez que os protocolos de criopreservação atualmente disponíveis ainda mostram grande variabilidade de respostas, seja entre ganhões ou mesmo entre ejaculados de um mesmo ganhão (Aurich et al., 1996; Vidament et al., 1997; Blottner et al., 2001), sendo que as razões dessas variações ocorrerem ainda não estão completamente entendidas. Observam-se também diferenças entre determinadas raças, já que algumas apresentam maior número de ganhões com espermatozoides resistentes à criopreservação, enquanto outras apresentam número limitado de ganhões com boa congelabilidade espermática.

Nesta linha de questionamentos e pesquisas, outro fator igualmente importante a ser considerado é a dificuldade de padronização dos critérios de avaliação seminal, quer em razão da diversidade e complexidade dos atributos a serem avaliados, quer em função da não-correlação desses atributos individualmente com o potencial de fertilização. Por esse motivo e aliado a recente regulamentação da utilização do sêmen congelado equino por parte da maioria das associações de raça, fato que fomentou a pesquisa na criopreservação de sêmen equino, um grande número de cientistas espalhados por todo o mundo tem procurado intensamente desenvolver novos testes laboratoriais que possam prever acuradamente a fertilidade do sêmen congelado equino. Entretanto, tais metas têm sido de difícil obtenção, em função da dificuldade de avaliar a diversidade de atributos que o espermatozoide deve possuir para fertilizar o ovócito.

Parâmetros convencionais utilizados na avaliação espermática, como o número total de espermatozoides, motilidade espermática total e progressiva, vigor e morfologia espermática, têm se mostrado limitados quanto à capacidade de estimar o potencial de fertilidade do sêmen. Um único teste tem se mostrado pouco eficaz devido ao fato de os espermatozoides apresentarem múltiplos compartimentos subcelulares e com diferentes funções a serem avaliadas, e ainda, em cada teste e amostra, somente poucos espermatozoides serem avaliados. Além dos parâmetros espermáticos convencionais utilizados na avaliação do

sêmen, outros testes têm sido desenvolvidos para avaliar a viabilidade espermática, o estado acrossomal, o estado mitocondrial, os estágios da capacitação espermática e a integridade do DNA. Outras técnicas para avaliação da estrutura da cromatina foram recentemente publicadas por Madrid-Burty et al. (2005), nas quais eles avaliaram a estabilidade estrutural da cromatina pelo tratamento dos espermatozoides com agentes quelantes como o EDTA. Além disso, devido às altas concentrações de ácidos graxos insaturados, o espermatozoide equino é particularmente susceptível a reações oxidativas, peroxidações lipídicas e também a lesões de DNA. Baumber et al. (2003) demonstraram que a criopreservação promove reação oxidativa e fragmentação de DNA na espécie equina, onde a adição de antioxidantes aos meios diluidores tem sido utilizada como método para diminuir as reações de peroxidação lipídicas. Infelizmente, até o presente momento, nenhum teste laboratorial isolado pode prever o potencial de fertilidade do sêmen congelado.

A utilização de diferentes fluorocromos e a citometria de fluxo vêm sendo adotadas em laboratórios para avaliação estrutural de células espermáticas no intuito de identificar os fatores que interferem na manutenção da sua integridade física e funcional, ajudando a avaliar e a entender os danos causados aos espermatozoides pelo processo de congelamento e descongelamento. Estes testes com diferentes métodos de coloração, onde não somente os fluorocromos isolados, como por exemplo, o Hoechst 333258, o iodeto de propídio, o SYBR-14, JC-1 entre tantos outros, mas também a utilização de associações de diferentes fluorocromos, aumentam a possibilidade de uma análise mais criteriosa da integridade estrutural dos espermatozoides. Segundo Arruda (2000), embora a utilização de sondas fluorescentes através de microscopia óptica ser um excelente método para avaliação da célula e do acrossomo, o número de espermatozoides normalmente examinados por essa análise não excede a 200 espermatozoides, número este nem sempre significativo para a validação da amostra. A citometria de fluxo surge então como uma técnica vantajosa sobre as outras técnicas clássicas para a avaliação da viabilidade e integridade espermática, uma vez que este sistema automatizado tem a capacidade de examinar 10.000 espermatozoides em menos de 2 minutos, permitindo maior exatidão nos resultados e diminuição no tempo de preparação requerido em outras técnicas fluorescentes. Colenbrander et al. (2003) e Neild et al. (2005) enfatizaram a necessidade de testar simultaneamente múltiplas funções e atributos das células espermáticas para prever a fertilidade do sêmen equino. No entanto, as desvantagens da técnica de citometria de fluxo são muitas, podendo-se citar o elevado custo do equipamento e a necessidade de mão-de-obra específica e altamente qualificada.

Nos últimos anos, uma maior atenção tem sido dada à avaliação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides, considerando a integridade desta membrana como requisito fundamental no processo de fertilização. Diversos estudos (Melo & Henry, 1999; Meyers, 2005) tem focado nos vários mecanismos de injúrias provocados pelo estresse osmótico sobre as estruturas lipídicas da membrana plasmática dos espermatozoides.

Para a avaliação dos parâmetros espermáticos pré e pós-descongelamento, foram escolhidos para este trabalho, além dos testes convencionais de avaliação espermática, alguns dos vários testes alternativos existentes. A escolha destes testes de avaliação foi baseada tanto nos parâmetros espermáticos avaliados como na exequibilidade destes testes em nosso laboratório e mesmo no campo. O teste hiposmótico foi primeiramente reportado por Drevius & Ericksson (1966), e desde então diversos pesquisadores (Jeyendran et al., 1984; Vasquez et al., 1997; Caiza de la Cueva et al., 1997; Melo & Henry, 1999; Neild et al., 1999, Neild et al., 2000) vêm trabalhando,

aperfeiçoando e preconizando seu uso como um dos métodos para avaliação da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides eqüinos criopreservados.

A escolha do teste hiposmótico como um dos parâmetros de avaliação seminal se baseia no fato de que esse teste tem sido continuamente estudado pelo nosso grupo de pesquisa e rotineiramente utilizado na avaliação espermática para diferentes espécies de animais domésticos, bem como para o ser humano, em diversos centros de pesquisa. Este teste, além de simples, acessível e de fácil execução, tem se mostrado confiável e bastante eficaz para predizer a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides.

O teste hiposmótico avalia predominantemente a funcionalidade da membrana plasmática da cauda dos espermatozóides. Baseia-se no transporte de fluídos através da membrana plasmática intacta dos espermatozóides sob condições hiposmóticas até que o equilíbrio entre os compartimentos seja alcançado. Em solução hiposmótica a célula espermática se expande devido ao influxo de fluídos predominantemente na região da cauda. Com o inchaço das membranas, as fibras da cauda dobram-se e enrolam-se, sendo essas alterações facilmente observadas em microscópio de contraste de fase. Os espermatozóides "inchados" ou "HOS positivo", chamados também de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico, são classificados como sendo espermatozóides com membrana plasmática funcionalmente intacta (Jeyendran et al., 1992).

A integridade funcional da membrana plasmática é determinante para os espermatozóides apresentarem metabolismo e funcionalidade normais, portanto, é esperado que, quanto mais espermatozóides preservarem esta característica, melhor será a qualidade do sêmen (Nie & Wenzel, 2001). Segundo Melo & Henry (1999) a habilidade do teste HO de avaliar a integridade funcional da membrana plasmática o torna um teste complementar importante na avaliação "in vitro" do sêmen criopreservado, uma vez que tanto a congelação quanto o resfriamento podem levar a efeitos deletérios sobre a mesma.

Neild et al. (2000), testando a correlação entre a fertilidade e o teste hiposmótico, utilizaram um protocolo onde uma amostra de sêmen *in natura* era incubada durante 30 minutos à temperatura de 37°C, diluída em solução de lactose a 50 mOsm. Nesse experimento os autores concluíram que o teste hiposmótico não apresenta correlação com a fertilidade, embora tenha mostrado tendência à correlação com o número de serviços por prenhez. Já Lagares et al. (2000) obtiveram índice de correlação de 0,64 entre a taxa de fertilidade e o teste hiposmótico, avaliado pelo espermatócrito, para a espécie eqüina.

Para avaliar a integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozóides de diferentes espécies animais, o uso de sondas fluorescentes e a citometria de fluxo têm proporcionado aos pesquisadores uma excelente ferramenta. Garner et al. (1986) descreveram para a espécie bovina e outras espécies animais o uso de dois fluorocromos, o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP). O iodeto de propídio é um corante fluorescente vermelho, que se liga especificamente ao DNA celular. Sendo o iodeto de propídio um corante impermeável à membrana plasmática intacta, este somente pode penetrar e corar células com lesões estruturais na membrana plasmática, colorindo estas células de vermelho fluorescente. Por sua vez, o diacetato de carboxifluoresceína é permeável à membrana plasmática, sendo de-esterificado no interior da célula por esterases não específicas, resultando numa carboxifluoresceína livre, fluorescente e impermeável à membrana plasmática intacta, que proporciona uma coloração verde

fluorescente em toda a célula, ficando contida internamente em todos os compartimentos celulares do espermatozoíde.

Harrison & Vickers (1990) descrevem um protocolo onde adicionam baixa concentração de formaldeído às soluções de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP), para imobilizar as células espermáticas sem causar danos estruturais às mesmas, permitindo a análise com auxílio do microscópio de fluorescência. Espermatozoides vivos são imobilizados com baixa concentração de formaldeído. Sob ação das esterases, as células liberam carboxifluoresceína livre (impermeáveis às membranas) que acumulam no interior do acrossoma, mitocôndria e citoplasma. Os espermatozoides íntegros acumulam carboxifluoresceína em todos os seus compartimentos; já as células que apresentam lesões na membrana plasmática podem corar o acrossoma ou a mitocôndria, ao passo que células com todas as membranas lesadas não são coradas. Essas células lesadas, por sua vez, são coradas pelo iodeto de propídio, impermeante à membrana plasmática íntegra.

O teste de termo resistência (TTR), proposto inicialmente por Dimitropoulos (1967) para avaliação de sêmen congelado bovino, tem sido atualmente preconizado para análise do sêmen congelado de diferentes espécies, no qual principalmente, os parâmetros de motilidade e vigor espermático são avaliados, devido em grande parte a facilidade de avaliação destes parâmetros. O teste consiste na incubação de uma amostra de sêmen descongelado em banho-maria, a uma temperatura e por um tempo pré-determinados, de acordo com a espécie animal, sendo a motilidade e o vigor espermático avaliados a cada intervalo de tempo pré-estabelecido.

Segundo Zúccari (1998), na utilização do teste de termo resistência para a espécie equina, ocorre uma variação considerável em relação ao tempo de incubação das amostras e a temperatura a que são submetidas ao banho-maria.

Como podemos verificar, muitos têm sido os estudos abordando a utilização de crioprotetores alternativos e associações destes, além de novos protocolos para melhorar a congelabilidade e, conseqüentemente, a fertilidade do sêmen equino congelado. Muito também tem sido pesquisado no que tange aos testes de avaliação espermática, na validação dos mesmos e na correlação destes com a fertilidade do sêmen para a espécie equina. Os resultados disponíveis na literatura demonstram que a técnica de congelamento de sêmen, particularmente em equinos, tem um grande espaço a ser percorrido e aprimorado. Existem vários etapas e procedimentos a serem executados, tanto no processamento, quanto no resfriamento, congelamento e mesmo no descongelamento, que podem influenciar substancialmente na manutenção da viabilidade espermática pós-descongelamento e conseqüentemente na melhoria dos índices de fertilidade.

Vista a necessidade atual de aprimorar a técnica de congelamento de sêmen equino, o presente estudo constituiu-se em diferentes experimentos com os seguintes objetivos: determinar se a substituição da gema de ovo completa pela fração de lipoproteínas de baixa densidade do ovo exerce um efeito crioprotetor mais eficaz sobre a célula espermática equina; estudar a interação entre os agentes crioprotetores alternativos, verificando o efeito de diferentes osmolaridades dos meios que poderiam maximizar o efeito crioprotetor do diluidor e direcionando as pesquisas para diferentes etapas do processamento de sêmen, enfocando ainda o aprimoramento de procedimentos metodológicos que, se devidamente ajustados, podem aumentar a viabilidade espermática pós-descongelamento e, conseqüentemente, a fertilidade do sêmen congelado dos equinos.

2. EXPERIMENTO I

Efeito das lipoproteínas de baixa densidade sobre diferentes crioprotetores e curvas de congelamento sobre os espermatozóides eqüinos criopreservados

RESUMO

Este experimento teve como objetivo determinar se a substituição da gema de ovo total pela fração de lipoproteínas de baixa densidade do ovo exerce um efeito crioprotetor mais eficaz sobre a célula espermática eqüina e qual seria a concentração de lipoproteínas de baixa densidade no meio diluidor mais indicada para se obter melhor efeito crioprotetor. Um ejaculado de 7 garanhões foi congelado em duas curvas de congelamento, uma rápida (palhetas mantidas a 3 cm do nível do nitrogênio líquido, durante 15 minutos) e uma lenta (queda de 0,5°C/min. até 5,0°C, e queda de 20°C/min. até -120°C, obtida em máquina computadorizada, Modelo TK 2000 – TETAKON – NUTRICELL); utilizando dois crioprotetores, glicerol ou dimetilformamida em diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade. O sêmen foi colhido com auxílio de vagina artificial e, imediatamente separado da porção gel, centrifugado a 400 x G por 12 minutos e ressuspenso no tratamento em teste. Cada tratamento testado utilizou o meio diluidor base INRA 82, acrescido da fração de lipoproteína de baixa densidade (LBL) e do crioprotetor proposto: **Tratamento 1:** INRA 82, com 5% de glicerol (controle), **Tratamento 2:** INRA 82, com 5% de glicerol e 5% de LBD, **Tratamento 3:** INRA 82, com 5% de glicerol e 10% de LBD, **Tratamento 4:** INRA 82, com 5% de glicerol e 20% de LBD, **Tratamento 5:** INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 5% de LBD, **Tratamento 6:** INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 10% de LBD, **Tratamento 7:** INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 20% de LBD, **Tratamento 8:** INRA 82, com 5% de dimetilformamida (controle). O descongelamento foi feito a 52°C por 10 segundos, seguidos de imersão em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Após o descongelamento foram avaliados os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático em microscopia óptica. Foram avaliadas as integridades funcionais e estruturais dos espermatozóides através dos testes hiposmótico e de fluorescência respectivamente. Os espermatozóides foram submetidos ao teste de termo resistência. A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância considerando o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 2 substâncias x 4 porcentagens de LBD, considerando os garanhões como bloco. As médias obtidas foram analisadas empregando-se o teste de Tukey. As lipoproteínas de baixa densidade, utilizadas nas concentrações de 10 e 20% mostraram ser tão eficientes em proteger os espermatozóides quanto a gema de ovo integral usada no INRA 82. A curva lenta foi superior a curva rápida para os parâmetros motilidade total, motilidade progressiva, vigor espermático, teste hiposmótico e teste de termo resistência, independente do crioprotetor utilizado. A dimetilformamida foi superior ao glicerol, nas duas curvas de congelamento, nas avaliações de motilidade total, motilidade progressiva, morfologia espermática, teste hiposmótico, número de espermatozóides lesados e teste de termo resistência.

Palavras-chave: sêmen, eqüino, criopreservação, lipoproteínas.

ABSTRACT

This experiment aimed to determine if the substitution of the total egg yolk for the low density lipoprotein fraction of the egg exerts a more effective cryoprotective effect on the equine sperm cell and what would be the concentration of low density lipoprotein in the diluent medium most appropriate for Better cryoprotective effect. An ejaculate of 7 stallions was frozen in two freezing curves, one rapid (reeds kept 3 cm from the liquid nitrogen level for 15 minutes) and one slow (drop from 0.5 ° C / min to 5.0 ° C, and fall 20°C / min up to – 120°C, obtained in computerized machine, Model TK 2000 - TETAKON - NUTRICELL); Using two cryoprotectants, glycerol or dimethylformamide at different concentrations of low density lipoproteins. The semen was collected with the aid of an artificial vagina and immediately separated from the gel portion, centrifuged at 400 x G for 12 minutes and resuspended in the test treatment. Each treatment tested the INRA 82 base dilution medium plus the low density lipoprotein (LBD) fraction and the proposed cryoprotectant: Treatment 1: INRA 82, with 5% glycerol (control), Treatment 2: INRA 82, with 5 Glycerol and 5% LBD, Treatment 3: INRA 82, with 5% glycerol and 10% LBD, Treatment 4: INRA 82, with 5% glycerol and 20% LBD, Treatment 5: INRA 82, with Treatment 5: INRA 82, 5% dimethylformamide and 10% LBD, Treatment 7: INRA 82, 5% dimethylformamide and 5% LBD, Treatment 6: INRA 82, With 5% dimethylformamide (control). The thawing was done at 52oC for 10 seconds, followed by immersion in a water bath at 37oC for 30 seconds. After thawing, the parameters of total motility, progressive motility and sperm vigor in light microscopy were evaluated. Functional and structural integrity of the spermatozoa were evaluated through hyposmotic and fluorescence tests, respectively. The spermatozoa were submitted to the endurance test. Statistical analysis was performed using the analysis of variance considering the randomized block design in factorial scheme 2 substances x 4 percentages of LBD, considering the stallions as a block. The averages obtained were analyzed using the Tukey test. Low-density lipoproteins used at concentrations of 10 and 20% were shown to be as efficient in protecting the spermatozoa as in the whole egg yolk used in INRA 82. The slow curve was superior to the rapid curve for the parameters total motility, progressive motility, Sperm vigor, hyposmotic test and endurance test, independent of the cryoprotectant used. Dimethylformamide was superior to glycerol in the two freezing curves, in evaluations of total motility, progressive motility, sperm morphology, hyposmotic test, number of spermatozoa injured and endurance test.

Keywords: semen, equine, cryopreservation, lipoproteins.

2.1 OBJETIVOS

- Determinar se a substituição da gema de ovo completa pela fração de lipoproteínas de baixa densidade do ovo exerce um efeito crioprotetor mais eficaz sobre a célula espermática equina
- Identificar a concentração de lipoproteínas de baixa densidade no meio diluidor mais indicada para se obter melhor efeito crioprotetor.

2.2 JUSTIFICATIVA

Muitos aspectos da criopreservação espermática ainda permanecem desconhecidos, principalmente no que diz respeito aos mecanismos criobiológicos básicos e ao estresse biofísico impostos aos espermatozóides durante os processos de congelamento e descongelamento. Os danos causados aos espermatozóides durante a criopreservação têm sido atribuídos a diversos fatores, como as mudanças de temperatura, formação de cristais de gelo, lesões oxidativas, alterações nas membranas espermáticas, lesões de DNA, toxicidade dos crioprotetores e estresse osmótico (Gao et al., 1993; Watson, 1995, 2000).

A gema do ovo de galinha é utilizada no congelamento de sêmen de mamíferos como agente crioprotetor complementar, em razão da sua capacidade de proteger os espermatozóides contra o choque térmico. Apesar de ser largamente utilizada, o preciso mecanismo pelo qual a gema de ovo protege os espermatozóides durante o processo de congelamento e descongelamento ainda não é totalmente conhecido. Por ter uma composição complexa, ainda não foram determinadas quais as substâncias presentes no ovo que exerceriam este efeito crioprotetor. As concentrações da gema do ovo utilizadas variam de 2% (Tischner, 1979; Palmer, 1984) a 20% (Martin et al., 1979; Graham, 1996; Vidament et al., 2001) da composição nos principais diluidores utilizados na criopreservação de sêmen equino.

Ecot et al. (2000), relataram que a concentração ideal da gema do ovo dependeria do agente crioprotetor permeante e de suas concentrações utilizadas e também da presença ou não de leite na composição deste meio diluidor. Segundo Vidament et al. (2001), novas pesquisas precisam ser conduzidas para se encontrar a concentração ideal da gema do ovo que deveria ser adicionada aos meios diluidores.

Em 1945, Mayer & Lasley isolaram da gema do ovo uma pequena fração, solúvel em solução fosfato, que protegeria melhor os espermatozóides contra o choque térmico, em relação à proteção oferecida pela gema de ovo total.

Diversos autores (Kampschmidt et al., 1953; Evans et al., 1968; Evans et al., 1973; Pace & Graham, 1974; Foulkes, 1977; Polge, 1980; Quinn et al., 1980; Watson, 1981; Demianowicz & Strzezek, 1996; Moussa et al., 2002; Manjunath & Therien, 2002) propuseram que a fração de baixa densidade da gema, composta principalmente por lipoproteínas de baixa densidade, poderia ser responsável pela resistência dos espermatozóides ao choque térmico, devido à capacidade de seus componentes estabilizarem e manter a integridade das membranas celulares. Em estudos realizados no sêmen do varrão, Demianowicz & Strzezek (1996) relataram maior sobrevivência dos espermatozóides resfriados do varrão no meio diluidor contendo lipoproteínas de baixa densidade em substituição à gema do ovo total. Trabalhos recentes (Mousa et al., 2002; Amirat et al., 2004) também relataram melhora na motilidade e habilidade de fertilizar para o sêmen criopreservado de bovinos, quando as lipoproteínas de baixa densidade foram utilizadas em substituição a gema do ovo total.

De acordo com Manjunath et al. (2002), as proteínas do plasma seminal podem ser nocivas à membrana plasmática dos espermatozóides; já as lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo se ligam de uma forma rápida, estável e específica às proteínas do plasma seminal, e esta ligação poderia prevenir a membrana plasmática dos espermatozóides dos efeitos nocivos do plasma seminal.

Nos últimos anos a simplificação das técnicas para obtenção das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo e a melhora da motilidade espermática e fertilidade obtida fomentaram o interesse pelo uso das mesmas nos meios diluidores (Moussa et al., 2002), além de servirem como indicativo de que as proteínas de baixa densidade obtidas da gema do ovo também deveriam ser testadas na espécie equina (Juliani et al., 2004).

Diante do exposto, realizou-se este experimento para testar a eficácia das lipoproteínas de baixa densidade obtidas da gema do ovo em substituição à gema de ovo total no congelamento de sêmen equino e se, uma vez comprovada esta hipótese, qual seria a fração ideal de lipoproteínas para substituir a gema de ovo.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Coleta de sêmen:

Foram utilizados sete garanhões, de duas diferentes raças, sendo quatro da raça Puro Sangue Lusitano e três da raça Mangalarga Marchador, com idade variando de três a quinze anos. Os garanhões tiveram suas reservas extragonadais equilibradas, por meio de coletas de sêmen ou montas diárias, durante sete dias consecutivos. Após o equilíbrio das reservas extragonadais, foi iniciado o congelamento do sêmen. A coleta foi realizada utilizando-se vagina artificial (modelo Hannover) de fundo fechado e, como manequim, uma égua em cio natural ou induzido.

2.3.2. Avaliação espermática pré e pós-descongelamento:

2.3.2.1. *Motilidade total e progressiva:*

Esses parâmetros foram avaliados em microscopia óptica, com aumento de 400 vezes, utilizando-se 5 µL de sêmen, colocado entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C. A motilidade progressiva foi determinada pela avaliação da porcentagem de células espermáticas que apresentaram movimento retilíneo e movimento circular aberto, pela avaliação de, no mínimo, cinco campos microscópicos. Somente foram utilizados para o congelamento os ejaculados que apresentaram motilidade espermática progressiva igual ou acima de 60%, após permanecerem 30 minutos em meio de centrifugação. Todo o material utilizado para as avaliações foi mantido sobre placa e platina aquecedoras, a 37°C.

2.3.2.2. *Vigor:*

O vigor espermático do movimento dos espermatozoides foi classificado numa escala de zero (ausente) a cinco (máximo).

2.3.2.3. *Concentração espermática:*

A concentração espermática foi avaliada no sêmen *in natura* e após centrifugação, diluindo-se as amostras em solução de formol-salina tamponada, na proporção de 1:100. A contagem de células realizou-se em câmara de Neubauer em microscopia óptica com aumento de 400 vezes. Não foram congelados ejaculados com concentração espermática abaixo de 60 milhões de espermatozoides por mL (Jasko, 1994).

2.3.2.4. Morfologia espermática:

A morfologia espermática foi avaliada em amostra de sêmen fresco e pós-descongelamento, sendo ambas as amostras preservadas em solução de formol-salina tamponada (Barth & Oko, 1989). As avaliações realizaram-se em microscopia de contraste de fase (100 células por amostra) de acordo com Nie & Wenzel, 2001. Só foram considerados, para congelamentos, os ejaculados com incidência de anormalidades morfológicas menores ou iguais a 30%.

2.3.2.5. Avaliação da integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides:

O teste hiposmótico (HO) foi empregado para esta avaliação. O teste consistiu na mistura de 100 µL de sêmen em 1,0 mL de solução de sacarose a 100 mOsmol/L, ambos a 37° C, seguida de incubação em banho-maria a 37° C por 30 minutos. Após este período, as amostras foram fixadas em 0,5 mL de solução de formol salina tamponada, para posterior análise em microscopia de contraste de fase. Foram avaliadas 100 células por amostra, em microscopia com aumento de 1250 vezes. O índice da integridade da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides foi calculado de acordo com o protocolo determinado por Melo & Henry (1999), seguindo a seguinte fórmula:

HO (%) = (% de alterações na região da cauda após teste HO) - (% de alterações na região da cauda dos espermatozoides do sêmen “in natura” antes do teste HO).

2.3.2.6. Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal da cabeça dos espermatozoides:

Foi realizada seguindo a técnica proposta por Harrison & Vickers (1990), com modificações citadas por Zúccari (1998), na qual dois fluorocromos foram utilizados: o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP). Foram avaliadas as membranas plasmáticas da cabeça e acrossomal, de acordo com a coloração apresentada pelos espermatozoides, sendo consideradas três categorias de espermatozoides: íntegros, lesados e semilesados. A leitura foi realizada em microscopia de epifluorescência.

2.3.2.7. Teste de Termo Resistência

O protocolo utilizado foi preconizado pela Comissão de Andrologia do Colégio Brasileiro de Reprodução animal – CBRA – (Neves & Henry, 1998). O teste consistiu na incubação do sêmen descongelado em banho-maria a 38°C, onde as amostras foram acondicionadas em tubos providos de tampa, e avaliações das variáveis motilidade total, motilidade progressiva e vigor foram realizadas a intervalos de trinta minutos, até o tempo máximo de 240 minutos. A avaliação da motilidade e vigor espermático seguiu o protocolo descrito anteriormente.

2.3.3. Processamento do sêmen para o congelamento

2.3.3.1. Avaliação pré-centrifugação

Da coleta até a centrifugação, o sêmen foi mantido diluído em meio INRA 82 (proporção 1:1) à temperatura ambiente, durante 15 minutos. O tempo de 15 minutos foi estabelecido devido à necessidade de transporte do sêmen do local da coleta até o laboratório para início da centrifugação.

2.3.3.2. Centrifugação

Para centrifugação, cada ejaculado foi dividido em oito alíquotas. As alíquotas foram centrifugadas a 400 x g por 12 minutos (Martin et al., 1979; Cristanelli et al., 1984; Heitland et al., 1996).

2.3.3.3. Ressuspensão dos espermatozoides em meio de congelamento

Depois de centrifugado foi retirado o sobrenadante de cada tubo, sendo o precipitado ressuspensionado na proporção de 1:2 no meio crioprotetor em teste. Foram avaliadas as motilidades total e progressiva, o vigor e a concentração espermática, seguindo a metodologia descrita anteriormente. A diluição final foi realizada para obter a concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL.

2.3.3.4. Envasamento

O sêmen foi envasado em palhetas de cloreto polivinílico de 0,5 mL, fechadas com massa de modelar atóxica de cores diferentes, sendo uma coloração da massa atribuída a cada tratamento proposto.

2.3.3.5. Congelamento

Todos os tratamentos propostos para este experimento foram submetidos a duas curvas de congelamento:

Curva 1: congelamento direto sobre o vapor de nitrogênio líquido, com as palhetas mantidas a 3 cm do nível do mesmo, durante 15 minutos e estocando-as, em seguida, em nitrogênio líquido até a avaliação das amostras.

Curva 2: queda de 0,5°C/minuto da temperatura ambiente até 5,0°C, e queda de 20°C/minuto até -120°C, obtida em máquina computadorizada¹, em seguida as palhetas foram submersas e estocadas em nitrogênio líquido, até a avaliação das amostras.

2.3.4. Descongelamento

O descongelamento das amostras foi realizado submergindo as palhetas em banho-maria a 52°C durante 10 segundos, seguido de imersão em banho-maria a 37°C por 30 segundos.

2.3.5. Meios diluidores

¹ Modelo TK 2000 – TETAKON – NUTRICELL NUTRIENTES CELULARES LTDA.

2.3.5.1. Meio de centrifugação:

As amostras foram centrifugadas utilizando-se o meio extensor básico INRA 82, modificado de Palmer (1984), onde a gema de ovo foi substituída, na mesma proporção, pelas lipoproteínas de baixa densidade extraídas da própria gema do ovo. (anexo 1)

2.3.5.2. Meio de congelamento:

Foram testados neste experimento oito diferentes tratamentos, utilizando como meio diluidor base à solução INRA 82 modificado (Palmer et al, 1984), descrito na tabela 15A (em anexo). Cada tratamento utilizou o meio diluidor base, acrescido da fração de lipoproteína de baixa densidade (LBD) e do crioprotetor proposto:

- **Tratamento 1:** meio INRA 82, com 5% de glicerol (controle).
- **Tratamento 2:** meio INRA 82, com 5% de glicerol e 5% de LBD.
- **Tratamento 3:** meio INRA 82, com 5% de glicerol e 10% de LBD.
- **Tratamento 4:** meio INRA 82, com 5% de glicerol e 20% de LBD.
- **Tratamento 5:** meio INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 5% de LBD.
- **Tratamento 6:** meio INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 10% de LBD.
- **Tratamento 7:** meio INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 20% de LBD.
- **Tratamento 8:** meio INRA 82, com 5% de dimetilformamida (controle).

2.3.5.3. Controle dos meios:

Os meios utilizados foram preparados em parceria com a empresa Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda e previamente testados em laboratório quanto à osmolaridade e pH. Para a determinação da osmolaridade utilizou-se também o Laboratório de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da UFMG, onde as avaliações foram realizadas em aparelho de precisão VAPRO².

2.3.6. Extração das lipoproteínas de baixa densidade

Para a extração das lipoproteínas foram utilizados ovos frescos de galinha. Após ser cuidadosamente lavado em água corrente, o ovo era quebrado manualmente, sendo a gema do ovo separada da clara; após a separação, era realizada a rolagem da gema em papel filtro para completa remoção da chalaza e restos de albumina de acordo com o método descrito por McBee & Cotteril, (1979). Em seguida realizava-se a ruptura da membrana vitelina e coleta da gema do ovo, utilizando-se seringa estéril. A gema era então diluída em solução salina isotônica (0,17M NaCl) e agitada por 1 hora. A seguir era realizada centrifugação por 45 minutos a 10°C a 10.000 x G.

² Vapor Pressure Osmometer, Model 5520 – WESCOR - Utah, USA.

Após a remoção do sobrenadante, este era recentrifugado na mesma intensidade e tempo. Após a coleta do sobrenadante era adicionado sulfato de amônio a 40% e realizada agitação durante 1 hora a 4°C. Realizava-se então nova centrifugação a 10.000 x g durante 45 minutos a 4°C.

A extração final das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo foi realizada por diálise, seguindo o protocolo descrito por Moussa et al., (2002), onde a solução permanecia em torno de 12 horas a 4°C, sendo novamente centrifugada nas mesmas condições descritas acima, para obtenção final das lipoproteínas de baixa densidade.

2.3.7. Análise Estatística

2.3.7.1 Para as Curvas 1 e 2 separadamente

Foi realizada uma análise de variância considerando o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 2 substâncias x 4 porcentagens de LBD, considerando os ganhões como blocos.

O modelo estatístico empregado foi:

$$y_{ijk} = \mu + b_k + s_i + p_j + (sp)_{ij} + e_{ijk}$$

Em que:

μ : média geral;

b_k : efeito do bloco, $k = 1, 2, \dots, 7$;

s_i : efeito da substância, $i = 1, 2$;

p_j : efeito da porcentagem de LBD, $j = 1, 2, 3, 4$;

$(sp)_{ij}$: efeito da interação substância x porcentagem de LBD;

e_{ijk} : erro experimental, tal que $e_{ijk} \cap NID(\mu, \sigma^2)$

As médias obtidas para substâncias e porcentagens de LBD foram analisadas empregando-se o teste de Tukey.

2.3.7.2 Para as Curvas 1 e 2 em conjunto

Foi realizada uma análise de variância considerando o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial 2 curva x 2 substâncias x 4 porcentagens de LBD, considerando os ganhões como blocos.

O modelo estatístico empregado foi:

$$y_{ijkl} = \mu + b_k + c_i + s_j + p_k + (cs)_{ij} + (cp)_{ik} + (sp)_{jk} + (csp)_{ijk} + e_{ijkl}$$

Em que:

μ : média geral;

b_k : efeito do bloco, $k = 1, 2, \dots, 7$;

c_i : efeito da curva, $i = 1, 2$;

s_j : efeito da substância, $j = 1, 2$;

p_k : efeito da porcentagem de LBD, $k = 1, 2, 3, 4$;

$(cs)_{ij}$: efeito da interação curva x substância;

$(cp)_{ik}$: efeito da interação curva x porcentagem de LBD;

$(sp)_{jk}$: efeito da interação substância x porcentagem de LBD;

$(csp)_{ijk}$: efeito da interação curva x substância x porcentagem de LBD;

e_{ijk} : erro experimental, tal que $e_{ijk} \cap \text{NID}(\mu, \sigma^2)$

As médias obtidas para curva, substâncias e porcentagens de LBD foram analisadas empregando-se o teste de Tukey ($\alpha > 0,05$).

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos da análise de variância referente às avaliações de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático pós-descongelamento, obtido para as curvas de congelamento 1 e 2, separadamente e em conjunto, estão apresentados nas tabelas 1.1A, 1.2A e 1.3A (em anexo). As análises dos dados apresentados nestas tabelas nos mostram que existem diferenças significativas entre os diferentes crioprotetores utilizados nos protocolos de congelamento de sêmen para os parâmetros motilidade total e vigor espermático pós-descongelamento para as curvas de congelamento 1 e 2 quando avaliadas separadamente; e diferença significativa para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático quando empregadas às duas curvas de forma conjunta.

Os resultados médios referentes às avaliações de motilidade total, motilidade progressiva e o vigor espermático pós-descongelamento do sêmen de 7 ganhões, em relação aos crioprotetores utilizados, para as duas curvas de congelamento, estão representados nas tabelas 1.1, 1.2 e 1.3.

Tabela 1.1: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, do sêmen de 7 ganhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1

Crioprotetor	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
Glicerol	31,43 a	26,25 a	3,29 a
Dimetilformamida	43,21 b	37,86 b	3,32 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio; Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$); Teste utilizado: Tukey. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 1.2: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, do sêmen de 7 garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2

Crioprotetor	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
Glicerol	43,29 a	38,04 a	3,54 a
Dimetilformamida	55,18 b	49,82 b	3,64 a

Curva 2: -5°C/min até 5°C, daí -20°C/min até -120°C. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$), pelo teste Tukey. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 1.3: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de 7 garanhões, obtidos pós-descongelamento para as 1 e 2 em conjunto

Crioprotetor	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
Glicerol	37,41 a	32,14 a	3,41 a
Dimetilformamida	49,19 b	43,84 b	3,48 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$), pelo teste Tukey. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Analisando estas tabelas podemos observar que, com exceção do vigor espermático, tanto os valores de motilidade total e motilidade progressiva obtidos pós-descongelamento foram superiores quando se utilizou a dimetilformamida em substituição ao glicerol como meio crioprotetor, independente da curva de congelamento utilizada. Ball e Vo (2001) demonstraram que o estresse osmótico induzido pela adição e remoção do glicerol é um importante fator responsável pela redução da motilidade e viabilidade pós-descongelamento do espermatozóide equino. Alvarenga e colaboradores (2005) reportaram que a dimetilformamida por possuir menor peso molecular e baixa viscosidade favoreceria um aumento da permeabilidade dos componentes da membrana plasmática, resultando em menor lesão osmótica ao espermatozóide equino quando comparadas as provocadas pelo glicerol.

Segundo Alvarenga et al. (2005) a utilização da dimetilformamida como crioprotetor, em comparação ao glicerol, proporciona ganho na motilidade espermática pós-descongelamento. Os resultados obtidos no presente experimento também mostram a mesma tendência e estão em concordância com outros relatos da literatura (Alvarenga et al. 2000; Graham, 2000; Vidament et al. 2002; Medeiros et al. 2002; Squires et al. 2004; Alvarenga et al. 2004; Osório et al. 2006; Juliani et al. 2007) que reportaram que a dimetilformamida protegeria os espermatozóides dos equinos tão bem quanto o glicerol, sendo um crioprotetor alternativo no congelamento de sêmen desta espécie. Medeiros et al. (2003), demonstraram que a motilidade total e progressiva após o descongelamento melhoraram significativamente quando os espermatozóides foram congelados na presença de acetamida comparado com glicerol a 5%, porém, motilidades similares foram encontradas na presença de dimetilformamida e metilformamida a 5%.

Medeiros et al. (2002) relataram que a utilização da dimetilformamida sozinha proporcionou maior motilidade espermática após o descongelamento do que quando utilizada em associação com outros crioprotetores para a espécie equina.

É interessante notar os elevados valores obtidos para a motilidade total e para a motilidade progressiva (55,18 e 49,82 respectivamente) quando se utilizou a dimetilformamida como agente crioprotetor associado ao uso da curva 2 de congelamento. Estes valores são similares aos valores encontrados por outros pesquisadores que utilizaram a dimetilformamida e curvas semelhantes (Martin, 2005; Osório et al., 2006; Juliani et al., 2007).

A tabela 1.4 apresenta os resultados de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático obtidos entre as duas curvas de congelamento avaliadas em conjunto para os três parâmetros: motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático. Os resultados obtidos nos mostram que todos os três parâmetros avaliados foram significativamente melhores considerando os dois crioprotetores em conjunto quando se utilizou a curva 2 de congelamento. Vidament et al. (2000) ao utilizarem o INRA 82 como diluidor, também verificaram melhor motilidade espermática pós-descongelamento para o sêmen resfriado a 4°C por uma hora antes do congelamento.

Tabela 1.4: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, do sêmen de 7 garanhões obtidos pós-descongelamento considerando os dois crioprotetores em conjunto para as curvas de congelamento 1 e 2

Curva	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
1	37,32 a	32,05 a	3,30 a
2	49,29 b	43,93 b	3,59 b

Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($\alpha < 0,05$). Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Vários trabalhos afirmaram que o choque térmico pelo frio é mais pronunciado quando o resfriamento ocorre de maneira rápida, sendo a severidade desse efeito dependente da curva de resfriamento, podendo as mudanças causadas nas membranas do espermatozóide serem irreversíveis quando do uso de uma curva inadequada (Watson, 1995; Graham, 1996).

Diferentes estudos têm comparado à eficácia da realização ou não de uma etapa de resfriamento lento, antes do congelamento propriamente dito (Cochran et al., 1984; Heitland et al., 1996; Osório et al., 2006). Cochran et al. (1984) não encontraram diferença significativa na motilidade progressiva pós-descongelamento quando utilizaram uma curva lenta de resfriamento até 5°C por um período de 30 minutos, comparado ao congelamento imediato. Os autores concluíram que ressuspender o sêmen centrifugado no meio diluidor e iniciar o processo do congelamento a 20°C é muito mais simples e rápido do que resfriar o sêmen até 5°C antes de envasá-lo nas palhetas. Já Heitland et al. (1996), encontraram valores maiores para a motilidade total e progressiva quando resfriaram o sêmen a 5°C antes de iniciar o congelamento ($p < 0,05$) sugerindo desta forma, no protocolo de congelamento de sêmen, o uso de resfriamento do sêmen diluído de 23° a 20°C

usando uma taxa de 0,7°C/min e, posteriormente, o resfriamento de 20°C a 5°C a uma taxa de 0,1°C/minuto.

Moran et al. (1992) relataram, utilizando um crioprotetor a base de leite, que entre as temperaturas de 37°C a 20°C, as curvas rápidas de resfriamento ($\geq -0,7^\circ\text{C}/\text{minuto}$) não estão associadas ao choque térmico e a indução de danos à célula espermática. Entretanto, para resfriamento abaixo de 20°C, uma curva rápida de resfriamento ($-0,7^\circ\text{C}/\text{minuto}$) está associada com o aumento de lesões provocadas pelo choque térmico, quando comparada a uma curva de resfriamento lenta ($-0,05^\circ\text{C}/\text{min}$). Cochran et al. (1984), comparando o efeito do congelamento entre uma curva rápida ($-160^\circ\text{C}/\text{min}$) e uma moderada ($10^\circ\text{C}/\text{min}$ de 20°C a -15°C e $25^\circ\text{C}/\text{min}$ de -15°C a -120°C), relataram que os espermatozoides dos equinos poderiam sofrer danos devido à curva de congelamento utilizada, apesar de não terem encontrado diferença significativa na motilidade espermática pós-descongelamento.

De acordo com Alvarenga et al. (2005), teoricamente, curvas rápidas de resfriamento e congelamento seriam indicadas para o congelamento de sêmen utilizando as amidas como crioprotetores, uma vez que estas apresentam diferenças entre permeabilidade e peso molecular quando comparadas ao glicerol. Porém estes pesquisadores relatam que não foi encontrada diferença estatística entre duas curvas de congelamento, moderada ($-20^\circ\text{C}/\text{min.}$) e rápida ($-70^\circ\text{C}/\text{min.}$) para o sêmen equino.

Moffet et al. (2003) utilizando a dimetilformamida como crioprotetor, também não encontrou diferença significativa para motilidade quando comparou duas curvas de congelamento, com ou sem resfriamento prévio. Osório et al. (2006) utilizaram para o congelamento máquina computadorizada, relataram que o resfriamento prévio até 5°C antes do congelamento não resultou em ganho para a motilidade espermática. Crabo (2001) relatou que os resultados similares encontrados para o congelamento em máquina computadorizada e o congelamento diretamente sobre o vapor de nitrogênio líquido não justificam a utilização da máquina computadorizada.

Em recente experimento, Juliani et al. (2007), não encontraram diferença estatística entre diferentes tempos de adição do crioprotetor (dimetilformamida) nem entre as curvas de congelamento utilizadas, quando as amostras foram resfriadas até 5°C utilizando máquina computadorizada a uma taxa de 0,25°C/minuto e congeladas em três diferentes curvas de congelamento.

Os valores de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático obtido pós-descongelamento quando a gema de ovo pura foi substituída pelas lipoproteínas de baixa densidade utilizando-se duas curvas de congelamento estão apresentados nas tabelas 1.5, 1.6 e 1.7. Os resultados apresentados nestas tabelas mostram que para os parâmetros de motilidade e vigor espermático, independente da curva de congelamento utilizada, mantiveram-se similares ($\alpha > 0,05$) quando foi realizada a substituição do meio base com gema de ovo pura pela lipoproteína de baixa densidade extraída da mesma, independentemente da concentração de lipoproteína de baixa densidade utilizada no meio.

Tabela 1.5: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de 7 garanhões obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1

% LBD	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
0	36,79 a	31,43 a	3,43 a
5	36,07 a	31,07 a	3,21 a
10	38,57 a	33,57 a	3,29 a
20	37,86 a	32,14 a	3,29 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio; Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$); Teste utilizado: Tukey.

Tabela 1.6: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de 7 garanhões obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2

% LBD	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
0	49,64 a	44,64 a	3,57 a
5	47,14 a	41,43 a	3,57 a
10	48,93 a	43,57 a	3,71 a
20	51,43 a	46,07 a	3,50 b

Curva 2: -5°C/min até 5°C, daí -20°C/min até -120°C. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$), pelo teste Tukey.

Uma comparação entre os valores numéricos apresentados nas tabelas 1.5 e 1.6 nos mostram que na curva 1 de congelamento não observamos nenhum valor obtido pós-descongelamento que alcançasse a faixa dos 40% de motilidade total e, em contra partida, todos os resultados de motilidade obtidos para a curva 2 de congelamento foram acima dos 40% de motilidade. Novamente aqui, observamos uma tendência de melhoria da motilidade quando a curva lenta de congelamento foi utilizada corroborando com os trabalhos de Furst et al. (2005) que mostraram o efeito benéfico do resfriamento de sêmen antes do congelamento.

Conforme pode ser observado na tabela 1.7, quanto às duas curvas de congelamento foram avaliadas simultaneamente, não ocorreu diferença estatística significativa para a motilidade e o vigor espermático quando comparamos as diferentes concentrações de lipoproteínas utilizadas no meio em substituição à gema de ovo total. Apesar de não termos encontrado diferença estatística, os valores numéricos obtidos para a motilidade total e motilidade progressiva, são expressivos para a espécie equina. Novamente, conforme foi observado quando comparamos a curva de congelamento e o meio crioprotetor utilizado, podemos observar que, os parâmetros de motilidade, total ou motilidade progressiva, foram numericamente superior para a curva 2, independente da concentração de lipoproteína de baixa densidade utilizada.

Tabela 1.7: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de 7 garanhões obtidas pós-descongelamento quando realizado a análise em considerando as curvas de congelamento 1 e 2 em conjunto

%LBD	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
0	43,21 a	38,04 a	3,50 a
5	41,61 a	36,25 a	3,39 a
10	43,75 a	38,57 a	3,50 a
20	44,64 a	39,11 a	3,39 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$), pelo teste Tukey.

Podemos verificar que, a gema de ovo pura pode ser substituída pelas lipoproteínas de baixa densidade até mesmo na menor proporção, que foi 5%, sem ocorrer qualquer prejuízo na motilidade total, na motilidade progressiva e no vigor espermático; mas também, esta substituição não proporcionou qualquer ganho adicional. Apesar da gema de ovo ter uma larga gama de componentes, e visto que, não ocorreu decréscimo de motilidade quando do uso puro, as lipoproteínas parecem ser um dos componentes, se não o componente da gema com maior efeito crioprotetor, conforme já referenciado por diversos pesquisadores (Kampschmidt et al., 1953; Moussa et al., 2002; Manjunath e Therien, 2002). Vale ressaltar lembrar que estes resultados foram encontrados usando o meio base INRA, o mesmo pode não ser verdadeiro para outro meio base. Outro fator a ser destacado é a melhor visualização dos campos proporcionado pelo meio a base de lipoproteínas de baixa densidade em relação a gema de ovo.

Os resultados obtidos para a análise de variância referente às avaliações de morfologia espermática pós-descongelamento referente às curvas de congelamento 1 e 2 separadamente e em conjunto estão apresentados nas tabelas 1.4A, 1.5A e 1.6A, em anexo. A análise destas tabelas nos mostra somente existir diferença significativa para o crioprotetor utilizado quando realizado o congelamento na curva 1. Quando empregadas às duas curvas de forma conjunta verificou-se não existir diferença significativa para morfologia espermática.

Os resultados médios referentes ao parâmetro morfologia espermática, em relação ao crioprotetor utilizado, glicerol ou dimetilformamida, do sêmen de 7 garanhões e nas duas diferentes curvas de congelamento estão representados nas tabelas 1.8, 1.9 e 1.10.

Tabela 1.8: Valores médios de morfologia espermática de 7 garanhões obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1

Crioprotetor	Espermatozoides normais
Glicerol	64,79 a
Dimetilformamida	68,49 b

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio; Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$); Teste utilizado: Tukey. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 1.9: Valores médios de morfologia espermática de 7 garanhões obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2

Crioprotetor	Espermatozoides normais
Glicerol	65,86 a
Dimetilformamida	66,36 a

Curva 2: -5°C/min até 5°C, daí -20°C/min até -120°C. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$), pelo teste Tukey. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

As médias de espermatozoides classificados como normais nesse experimento se encontram dentro dos valores reportados pela literatura (Snoeck, 2003; Cottorello, 2003; Juliani, 2003; Alves et. al., 2005) para a espécie equina.

Avaliando as médias dos valores de espermatozoides normais obtidos pós-descongelamento, tabela 1.8, observamos que, para a curva 1 ocorreu diferença estatística significativa, sendo que, um maior número de espermatozoides normais foi observado quando se utilizou a dimetilformamida como crioprotetor. Já para a curva 2, conforme pode ser avaliado pela tabela 1.9, não foi encontrada diferença estatística independente do crioprotetor utilizado no congelamento. Isto pode, em parte, ser explicado devido ao maior efeito crioprotetor oferecida pela dimetilformamida em comparação ao glicerol, quando a curva utilizada foi à rápida (curva 1), curva que, teoricamente levaria a mudanças mais rápidas da estrutura das membranas plasmáticas, fato que exige uma maior adaptação destas membranas as modificações bruscas de temperatura. A severidade dessa mudança de temperatura ocasionaria mudanças irreversíveis na membrana plasmática dos espermatozoides, tornando-os incapazes de realizar suas atividades metabólicas. Hammerstedt e Graham (1992) reportaram os efeitos deletérios do glicerol nas células, principalmente as mudanças ocorridas no citoplasma. Segundo Alvarenga et al. (2005), a utilização das amidas como crioprotetores penetrantes nos extensores seminais para o sêmen equino proporciona além de um incremento na motilidade espermática pós-descongelamento uma melhor preservação da integridade das membranas plasmáticas quando comparado ao glicerol; possibilitando o congelamento de sêmen de garanhões classificados como maus congeladores de sêmen. Conforme resultados obtidos neste experimento, a dimetilformamida ofereceria, mesmo com uma curva rápida de congelamento, uma maior proteção às membranas espermáticas, ocorrendo então, menores danos as células espermáticas.

A análise da tabela 1.10, quando as duas curvas foram avaliadas simultaneamente, permite verificar que a dimetilformamida, se mostrou superior ao glicerol em relação ao parâmetro morfologia espermático, independente da curva de congelamento utilizado.

Tabela 1.10: Valores médios de morfologia espermática de 7 garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado a análise considerando as curvas de congelamento 1 e 2 em conjunto

Crioprotetor	Espermatozoides normais
Glicerol	65,32 a
Dimetilformamida	67,39 b

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$), pelo teste Tukey. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

A avaliação da morfologia espermática em relação à concentração de lipoproteína de baixa densidade utilizada em substituição à gema de ovo total do meio diluidor pode ser avaliada pelos resultados das tabelas 1.11 e 1.12.

Tabela 1.11: Valores médios de morfologia espermática de 7 garanhões, obtida pós-descongelamento utilizando a curva 1

% LBD	Espermatozoides normais
-------	-------------------------

0	66,14 a
5	67,64 a
10	65,00 a
20	67,64 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio; Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$), pelo teste Tukey.

Tabela 1.12: Valores médios de morfologia espermática do sêmen de 7 garanhões, obtida pós-descongelamento utilizando a curva 2

% LBD	Espermatozóides normais
0	66,64 a
5	64,50 a
10	66,36 a
20	66,99 a

Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C, daí -20°C/min até -120°C. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$), pelo teste Tukey.

Verificamos que, independente da curva de congelamento utilizada, não ocorreu diferença significativa pós-descongelamento do sêmen para a morfologia espermática em relação às diferentes concentrações de lipoproteínas.

Nas tabelas 1.13 estão apresentados os resultados de morfologia espermática obtidos pós-descongelamento considerando simultaneamente as duas curvas de congelamento em função da concentração de lipoproteína de baixa densidade. Conforme pode ser observada nesta tabela, não ocorreu diferença significativa para morfologia espermática em relação às diferentes concentrações de lipoproteínas.

Tabela 1.13: Valores médios de morfologia espermática de 7 garanhões, obtido pós-descongelamento quando realizado a análise considerando as curvas de congelamento 1 e 2 em conjunto

%LBD	Espermatozóides normais
0	66,39 a
5	66,07 a
10	65,69 a
20	67,29 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$), pelo teste Tukey. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Na tabela 1.14 estão demonstrados os valores de morfologia espermática encontrados para cada uma das curvas de congelamento considerando todos os valores de lipoproteína e os dois crioprotetores em conjunto.

Tabela 1.14: Valores médios de morfologia espermática de 7 garanhões, obtido pós-descongelamento quando realizado a análise considerando as curvas de congelamento 1 e 2 em conjunto

Curva	Espermatozóides normais
1	66,61 a
2	66,11 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$), pelo teste Tukey. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Não foi observada diferença significativa para morfologia espermática comparando-se as duas curvas de congelamento. Novamente a proteção foi igual para morfologia independentemente da concentração de lipoproteína e curva utilizada. Vale ressaltar que a análise de morfologia espermática, apesar de ser feita sob imersão é um teste que apresenta limitações, portanto os achados devem ser considerados com reserva.

Os resultados obtidos para a análise de variância referente ao teste hiposmótico (HO) para as curvas de congelamento 1 e 2 separadamente e em conjunto estão apresentados nas tabelas 1.7A, 1.8A e 1.9A, em anexo. Os resultados encontrados nestas tabelas indicam que existem diferenças significativas entre as diferentes substâncias utilizadas em relação ao teste hiposmótico quando se utilizou a curva 1 para o congelamento; e que, quando empregadas às duas curvas de congelamento de forma conjunta verificou-se existir diferença significativa para o crioprotetor e a curva utilizada. Novamente, conforme observamos para a morfologia espermática também para o teste hiposmótico, somente a curva de congelamento 1 apresentou valores maiores para reatividade ao teste hiposmótico, quando esta foi avaliada separadamente.

Os resultados médios de reatividade dos espermatozóides ao teste hiposmótico obtido pós-descongelamento, em relação ao crioprotetor, utilizado glicerol ou dimetilformamida, e utilizando duas curvas diferentes de congelamento estão representados nas tabelas 1.15, 1.16, 1.17 e 1.18.

Conforme pode ser avaliado na tabela 1.15, a curva 2 de congelamento preservou melhor a integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozóides, avaliada pelo teste hiposmótico do que a curva de congelamento 1.

Tabela 1.15: Valores médios de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico de 7 garanhões, obtido pós-descongelamento considerando os dois crioprotetores simultaneamente para as curvas de congelamento 1 e 2

Curva	Espermatozóides reativos ao teste HO (%)
1	29,95 a
2	35,59 b

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$), pelo teste Tukey. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Os melhores resultados obtidos para a curva 2 se assemelham aos valores normais obtidos para a espécie equina (Melo et al., 2005; Alves et al., 2005; Martin, 2005; Furst et al., 2005; Juliani et al., 2007) e indicam que a curva lenta de congelamento preservaria melhor a funcionalidade da

membrana plasmática, talvez por permitir uma melhor adaptação da membrana plasmática, particularmente da cauda, às modificações estruturais e injúrias impostas pelo processo de criopreservação.

Segundo Meyers (2005), durante o processo de resfriamento os espermatozóides são expostos a modificações em numerosos atributos celulares em função de modificações na temperatura e condições osmóticas. Estas modificações alterariam a permeabilidade a água, provocando modificações no citoesqueleto celular, e conseqüentemente, na composição lipídica da membrana plasmática. Isto levaria a alteração na tolerância osmótica. Os limites de tolerância osmótica para a espécie equina foram determinados por Ball e Vo (2001), que, relatam que a resistência a anisomolaridade é essencial para prevenir à lise celular e que a capacidade do espermatozóide responder as modificações do volume celular durante o congelamento é determinada por vários fatores, entre eles, a composição fosfolipídica da membrana. A aptidão que a membrana plasmática da cauda do espermatozóide possui em expandir-se na presença de uma solução hiposmótica é um indicativo de que o transporte de água através da membrana está ocorrendo normalmente (Jeyendran et al. 1984).

Furst et al. (2005) reportaram o efeito benéfico do resfriamento do sêmen equino, ao relatarem uma maior reação ao teste hiposmótico ($p < 0,05$) quando resfriou-se lentamente os espermatozóides até 5°C antes do congelamento. O resfriamento lento dos espermatozóides antes de seu congelamento, aparentemente, conferiu maior eficiência na preservação da integridade funcional da membrana plasmática, provavelmente por protegê-la contra o choque térmico na faixa de temperatura crítica, entre 19 e 8°C.

Ao contrário dos resultados obtidos nesse experimento, Juliani e colaboradores (2007), utilizando uma taxa de resfriamento de 0,25°C por minuto, utilizando máquina computadorizada, não observaram diferença significativa para o teste hiposmótico em relação a curva de congelamento. Considerando a similaridade dos protocolos utilizados, podemos explicar a diferença de resultados baseando nas diferentes taxas de resfriamento utilizadas, 0,25°C/minuto x 0,5°C/minuto. A velocidade de redução da temperatura durante o congelamento tem sido um dos fatores mais importantes no processo de criopreservação, visto que o grau de lesões celulares depende da curva de resfriamento (Watson, 1995).

Tabela 1.16: Valores médios de reatividade dos espermatozóides de 7 garanhões ao teste hiposmótico (HO), obtido após descongelamento em função do crioprotetor utilizando a curva 1 de congelamento

Crioprotetor	Espermatozóides reativos ao teste HO (%)
Glicerol	27,89 a
Dimetilformamida	32,00 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio; Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. HO = percentual de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 1.17: Valores médios de reatividade dos espermatozóides de 7 garanhões ao teste hiposmótico (HO), obtido pós-descongelamento utilizando a curva 2

Crioprotetor	Espermatozóides reativos ao teste HO (%)
---------------------	---

Glicerol	34,14 a
Dimetilformamida	37,04 a

Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Em relação ao crioprotetor utilizado, não foi observado diferença significativa para o teste hiposmótico quando estes crioprotetores foram comparados respectivamente nas curvas 1 e 2 de congelamento. É importante ressaltar que, novamente, os valores numéricos obtidos foram superiores, independente do crioprotetor utilizado, quando os espermatozóides foram congelados na curva 2.

Pela avaliação dos resultados das duas curvas de congelamento simultaneamente, tabela 1.18, podemos identificar a superioridade da dimetilformamida sobre o glicerol em relação à integridade funcional da membrana plasmática. Meyers (2005) relata que o glicerol induz grande estresse osmótico quando comparado a outros crioprotetores no congelamento de espermatozóide equino.

Alvarenga e colaboradores (2005) reportaram que a dimetilformamida por possuir menor peso molecular e baixa viscosidade talvez apresente uma maior permeabilidade favorecendo sua entrada e efeito protetor com menos dano a membrana plasmática, resultando em menor lesão osmótica ao espermatozóide equino quando comparadas a aquela provocada pelo glicerol. Ball & Vo (2001) avaliando quatro diferentes crioprotetores: o glicerol, o etilenoglicol, o propilenoglicol e o dimetilsulfóxido (DMSO), relataram que os espermatozóides eqüinos têm um baixo limite de tolerância a variação osmótica, e que o glicerol induz um maior estresse osmótico e as mais severas alterações na viabilidade celular, em relação aos demais crioprotetores avaliados. A menor viscosidade e o menor peso molecular da dimetilformamida (PM = 73) em relação ao glicerol (PM = 92) proporcionariam uma maior facilidade de transpor a membrana plasmática resultando em menor dano osmótico.

Tabela 1.18: Valores médios de reatividade dos espermatozóides de 7 garanhões ao teste hiposmótico, obtido pós-descongelamento quando realizado a análise considerando as curvas de congelamento 1 e 2 em conjunto

Crioprotetor	Espermatozóides reativos ao teste HO
Glicerol	31,02 a
Dimetilformamida	34,52 b

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. HO = percentual de espermatozóides reativo ao teste hiposmótico. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

As tabelas 1.19, 1.20 e 1.21 comparam os valores obtidos no teste hiposmótico em relação às diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade testadas em substituição à gema de ovo total.

Os resultados apresentados mostram que não ocorreu diferença significativa quando avaliamos as diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade em substituição a gema de ovo total em relação à integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide avaliada pelo teste hiposmótico. Estes resultados corroboram com os resultados apresentados por Martin (2005) que, para a espécie equina, não encontrou diferença estatística significativa quando utilizou a lipoproteína de baixa densidade na concentração de 8% em substituição à gema de ovo total. Independente da concentração de lipoproteína e da curva de congelamento utilizada, os valores numéricos obtidos neste experimento encontram-se dentro dos valores de teste hiposmótico comumente reportados para a espécie equina (Melo & Henry, 1999; Martin, 2005; Osório et al, 2006; Juliani et al, 2007).

Tabela 1.19: Valores médios de reatividade dos espermatozóides de 7 garanhões ao teste hiposmótico, obtido pós-descongelamento utilizando a curva 1

% LBD	Espermatozóides reativos ao teste HO
0	31,64 a
5	29,93 a
10	27,86 a
20	30,36 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. HO = percentual de espermatozóides reativo ao teste hiposmótico.

Tabela 1.20: Valores médios de reatividade dos espermatozóides de 7 garanhões ao teste hiposmótico, obtido pós-descongelamento utilizando a curva 2

% LBD	Espermatozóides reativos ao teste HO
0	36,79 a
5	34,36 a
10	35,43 a
20	35,79 a

Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C daí -20°C/min até -120°C. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. HO = percentual de espermatozóides reativo ao teste hiposmótico.

Tabela 1.21: Valores médios de reatividade dos espermatozóides de 7 garanhões ao teste hiposmótico, obtido pós-descongelamento quando realizado a análise considerando as curvas de congelamento 1 e 2 em conjunto

%LBD	Espermatozóides reativos ao teste HO
0	34,21 a
5	32,14 a
10	31,64 a
20	33,07 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey.

Chamamos a atenção que, apesar de não apresentar diferença significativa em relação às concentrações de lipoproteínas, os valores numéricos obtidos para a curva 2 são superiores aos obtidos pela curva 1 de congelamento.

Observa-se que o resfriamento gradativo dos espermatozóides, realizado pela curva 2, antes do congelamento, proporcionou melhor proteção aos espermatozóides conforme avaliação da funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico. Verificamos que a dimetilformamida se mostrou melhor e que novamente não houve diferença entre a gema e todas as diferentes concentrações de lipoproteínas utilizadas.

Os resultados obtidos pela análise de variância referente às avaliações da integridade estrutural das membranas dos espermatozóides de sete garanhões após o descongelamento, utilizando a técnica de fluorescência estão apresentados nas tabelas 1.10A, 1.11A e 1.12A (em anexo). As análises destas tabelas mostram que para a curva 1 de congelamento existem diferenças significativas entre os diferentes crioprotetores utilizados no presente experimento para o parâmetro integridade estrutural de membrana plasmática; já para a curva 2, existiu diferença significativa para as diferentes concentrações de lipoproteína em relação ao número de espermatozóides íntegros. Quando empregadas às duas curvas de forma conjunta verificou-se existir diferença estatística significativa para, curva de congelamento, crioprotetor utilizado e diferentes concentrações de lipoproteína.

Nas tabelas 1.22, 1.23 e 1.24, estão apresentados os resultados médios referente à frequência de espermatozóides íntegros, lesados e semilesados de 7 garanhões, avaliados pela técnica de fluorescência, avaliados após o descongelamento usando duas curvas de congelamento e duas substâncias crioprotetoras.

Tabela 1.22: Valores médios de integridade de membranas espermáticas de 7 garanhões ao descongelamento utilizando dois crioprotetores e a curva 1 de congelamento.

Crioprotetor	SPTZ Íntegros	SPTZ Semilesados	SPTZ Lesados
Glicerol	49,36 a	7,04 a	43,61 a
Dimetilformamida	56,50 b	7,39 a	36,11 b

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio; Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. Teste de fluorescência com carboxifluoresceína e iodeto de propídio; SPTZ : espermatozóides. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 1.23: Valores médios de integridade de membranas espermáticas de 7 garanhões ao descongelamento utilizando dois crioprotetores e a curva 2 de congelamento

Crioprotetor	SPTZ Íntegros	SPTZ Semilesados	SPTZ Lesados
Glicerol	52,50 a	10,21 a	37,29 a
Dimetilformamida	55,46 a	9,64 a	35,29 a

Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. Teste de fluorescência com carboxifluoresceína e iodeto de propídio; SPTZ : espermatozóides. Os

resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

A análise destas tabelas indica que somente para a curva de congelamento 1 ocorreu diferença estatística. Conforme pode ser observado na tabela 1.22, o número de espermatozóides íntegros foi superior quando o sêmen foi congelado utilizando a dimetilformamida como agente crioprotetor. Inversamente à porcentagem de espermatozóides íntegros, a porcentagem de espermatozóides lesados, avaliados pela técnica de fluorescência, aumentou quando no congelamento foi utilizado o glicerol. A população de células semilesados, categoria intermediária entre as células íntegras e as células lesadas, não diferiu substancialmente entre os meios diluidores. Os valores obtidos nesse experimento se aproximam dos valores citados na literatura (Snoeck, 2003; Osório, 2006; Juliani et al, 2007). Fica evidente também nestes resultados que a curva apresenta vantagens visto que a diferença existente entre o glicerol e a dimetilformamida quando do uso da curva 1 desaparece quando os espermatozóides foram submetidos à curva 2.

Tabela 1.24: Valores médios de integridade de membranas espermáticas de 7 garanhões ao descongelamento utilizando dois crioprotetores quando realizado a análise considerando as curvas de congelamento 1 e 2 em conjunto

Crioprotetor	SPTZ Íntegros	SPTZ Semilesados	SPTZ Lesados
Glicerol	50,93 a	8,52 a	40,45 a
Dimetilformamida	55,98 a	8,62 a	35,70 b

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. Técnica de fluorescência com carboxifluoresceína e iodeto de propídio; SPTZ : espermatozóides. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Conforme pode ser observado na tabela 1.24, quando as duas curvas de congelamento foram avaliadas simultaneamente para os crioprotetores utilizados, verificamos que para o percentual de células espermáticas íntegras, a dimetilformamida se mostrou numericamente superior ao glicerol, apesar de não apresentar diferença estatística; já em relação ao número de espermatozóides lesados, a dimetilformamida foi não só numérica, mas estatisticamente superior ao glicerol. Diversos pesquisadores (Amann & Pickett, 1987; Samper et al., 1991) relatam os efeitos tóxicos do glicerol, sendo o processo de criopreservação responsabilizado por alterações estruturais e morfológicas dos espermatozóides.

As tabelas 1.25, 1.26 e 1.27 apresentam valores médios dos resultados do teste de fluorescência em relação às diferentes concentrações de lipoproteínas de baixa densidade utilizadas para as duas diferentes curvas de congelamento. Podemos observar que não existiu neste experimento, diferença estatística para a curva 1. Já para a curva 2 de congelamento foi detectada diferença significativa para o número de espermatozóides íntegros, onde observamos inferioridade na preservação da integridade estrutural da membrana para a lipoproteína a 5% somente em relação à gema total. As concentrações de 10 e 20% de lipoproteínas usadas em substituição à gema de ovo total, não diferiram entre si nem da concentração de 5%. A baixa ação crioprotetora da

lipoproteína de baixa densidade na concentração de 2,5 e 5% foram reportadas por Juliani e colaboradores em 2004.

Tabela 1.25: Valores médios de integridade de membranas espermáticas de 7 garanhões após o descongelamento utilizando diferentes concentrações de lipoproteínas no meio diluidor utilizando a curva 1 de congelamento

% LBD	SPTZ Íntegros	SPTZ Semi lesados	SPTZ Lesados
0	55,86 a	6,64 a	37,50 a
5	53,29 a	7,93 a	38,79 a
10	50,00 a	7,14 a	42,85 a
20	52,57 a	7,14 a	40,29 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio; Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. Técnica de fluorescência com carboxifluoresceína e iodeto de propídio; SPTZ : espermatozóides. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 1.26: Valores médios de integridade de membranas espermáticas de 7 garanhões após o descongelamento utilizando diferentes concentrações de lipoproteínas no meio diluidor utilizando a curva 2 de congelamento

% LBD	SPTZ Íntegros	SPTZ Semi lesados	SPTZ Lesados
0	57,36 b	9,36 a	34,00 a
5	51,43 a	10,14 a	38,49 a
10	52,07 ab	11,00 a	36,99 a
20	55,07 ab	9,21 a	35,79 a

Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. Técnica de fluorescência com carboxifluoresceína e iodeto de propídio; SPTZ : espermatozóides. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 1.27: Valores médios de integridade de membranas espermáticas de 7 garanhões ao descongelamento utilizando diferentes concentrações de lipoproteínas no meio diluidor quando realizado a análise considerando as curvas de congelamento 1 e 2 em conjunto

%LBD	SPTZ Íntegros	SPTZ Semi lesados	SPTZ Lesados
0	56,61 a	8,00 a	35,75 a
5	52,36 ab	9,04 a	38,61 a
10	51,04 b	9,07 a	39,89 a
20	53,82 ab	8,18 a	38,04 a

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. Técnica de fluorescência com carboxifluoresceína e iodeto de propídio; SPTZ : espermatozóides. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

É importante chamar atenção para os valores numéricos obtidos para a integridade estrutural dos espermatozoides neste experimento, onde, independente da curva de congelamento utilizada a gema de ovo total mostrou tendência de superioridade comparada a todas as concentrações de lipoproteínas de baixa densidade. Isto sugere que, alguma substância, que exerceria um efeito aditivo para a crioproteção celular poderia ter sido desprezada durante o processo de extração destas lipoproteínas.

Frente a estes resultados, foi analisado o efeito da porcentagem de lipoproteínas de baixa densidade para cada um dos crioprotetores separadamente, para a variável número de espermatozoides íntegros quando utilizada a curva 2 de congelamento, conforme pode ser visto na tabela 1.28.

Tabela 1.28: Porcentagem média de espermatozoides íntegros de 7 ganhões obtidos pós-descongelamento para as diferentes concentrações de lipoproteína e tipos de crioprotetor utilizando a curva 2 de congelamento

%LBD	Glicerol	Dimetilformamida
0	57,29 a A	57,43 a A
5	50,14 a A	52,71 a A
10	51,00 a A	53,14 a A
20	51,57 a A	58,57 a B

Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si na coluna e pela mesma letra maiúscula na linha, médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. Técnica de fluorescência com carboxifluoresceína e iodeto de propídio; SPTZ : espermatozoides.

A análise da tabela 1.28 indica que, somente quando substituímos a gema de ovo total por 20% de lipoproteínas de baixa densidade a dimetilformamida foi superior ($\alpha < 0,05$) ao glicerol na preservação da integridade estrutural das membranas espermáticas após o descongelamento avaliada pelo teste de fluorescência. Nas demais concentrações de lipoproteínas utilizadas neste experimento não encontraram diferenças entre os dois crioprotetores avaliados.

Nas tabelas 1.29 e 1.30, estão apresentados as frequências médias de espermatozoides íntegros, lesados e semilesados, de sete ganhões, avaliados segundo a técnica de fluorescência, após o descongelamento considerando os dois crioprotetores em conjunto e as curvas de congelamento separadamente.

Pela avaliação da tabela 1.29 constatamos que a curva 2 de congelamento foi superior em relação à curva 1 somente para a porcentagem de espermatozoides lesados, ou seja, a curva 2 de congelamento de certa forma protegeu melhor os espermatozoides do que a curva 1. Vários estudos têm comparado à eficácia da realização ou não de uma etapa de resfriamento, antes do congelamento propriamente dito (Cochran et al., 1984; Heitland et al., 1996; Osório et al., 2006).

Era esperado encontrar também uma maior porcentagem de espermatozoides íntegros para a curva 2, porém, esta hipótese não foi confirmada. O motivo disto parece ser em função do crescimento do percentual de espermatozoides semilesados encontrados na curva 2.

Tabela 1.29: Valores médios de integridade de membranas espermáticas de 7 garanhões ao descongelamento utilizando utilizando diferentes curvas quando realizado a análise considerando as curvas de congelamento 1 e 2 em conjunto

Curva	SPTZ Íntegros	SPTZ Semilesados	SPTZ Lesados
1	52,93 a	7,21 a	39,86 a
2	53,98 a	9,99 a	36,29 b

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey. Técnica de fluorescência com carboxifluoresceína e iodeto de propídio; SPTZ : espermatozóides. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade.

Face a estes resultados, foi realizado o desdobramento dos crioprotetores dentro de curvas para a categoria de espermatozóides lesados, obtidos pelo teste de fluorescência para as curvas 1 e 2 simultaneamente, conforme pode ser avaliado na tabela 1.30.

Tabela 1.30: Percentual médio de espermatozóides lesados de sete garanhões, obtidos pós-descongelamento para crioprotetores e curvas de congelamento separadamente

Crioprotetor	Curva 1	Curva 2
Glicerol	43,61 a A	37,29 a B
Dimetilformamida	36,11 b A	35,29 a B

Curva 1: congelamento no vapor de N₂ a 3 cm da fase líquida com posterior imersão no nitrogênio; Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C abaixo desta temperatura -20°C/min até -120°C com posterior imersão no nitrogênio. Teste utilizado: Tukey. Técnica de fluorescência com carboxifluoresceína e iodeto de propídio; SPTZ : espermatozóides. Os resultados foram analisados considerando todas as concentrações de gema e lipoproteína de baixa densidade. Médias na coluna seguidas de letra minúscula diferem entre si e nas linhas médias seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam, desigualdade.

A tabela 1.30 mostra que, em relação ao número de espermatozóides lesados avaliado pelo teste de fluorescência, ocorreu diferença estatística entre crioprotetores somente na curva de congelamento 1, apesar de, numericamente a dimetilformamida ter sido superior ao glicerol em ambas as curvas de congelamento. Quando avaliamos as curvas de congelamento, encontramos diferença estatística independente do crioprotetor utilizado, sendo a curva 2 superior tanto para o glicerol quanto para a dimetilformamida, apresentando os menores valores obtidos para número de espermatozóides lesados.

Os resultados da análise de variância referente ao teste de termo resistência para os parâmetros motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático pós-descongelamento, obtido para as curvas de congelamento 1 e 2, separadamente e em conjunto, estão apresentados nas tabelas 1.13A e 1.14A (em anexo). As avaliações destas tabelas nos permitem concluir que existem diferenças significativas entre tempos de avaliação e os diferentes crioprotetores utilizados nos protocolos de congelamento de sêmen para os parâmetros motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático pós-descongelamento para as curvas de congelamento 1 e 2 quando avaliadas separadamente; e interação entre tempo de avaliação e crioprotetores.

Os resultados médios referentes às avaliações do teste de termo resistência para os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e o vigor espermático pós-descongelamento, do sêmen de sete garanhões nas duas curvas de congelamento estão representados nas tabelas 1.31, 1.32, 1.33, 1.34, 1.35, 1.36, 1.37, 1.38, 1.39 e 1.40.

As tabelas 1.31 e 1.36 avaliam os resultados médios do teste de termo resistência (TTR) para os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e o vigor espermático obtidos para as duas curvas de congelamento utilizadas neste experimento. Com relação às motilidades e ao vigor espermático ao longo do TTR, verificamos que ocorreu diferença significativa entre os crioprotetores utilizados, em ambas as curvas de congelamento, tendo a dimetilformamida superado o glicerol pela avaliação global de todos os tempos avaliados.

Tabela 1.31: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, de sete garanhões, obtidos pelo teste de termo resistência, pós-descongelamento utilizando a curva 1.

Crioprotetor	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
Glicerol	12,57 a	9,41 a	1,67 a
Dimetilformamida	17,88 b	14,23 b	1,96 b

Curva 1: congelamento a 3 cm do vapor de N₂; Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey.

Para o teste de termo resistência em relação às diferentes concentrações de lipoproteínas utilizadas em substituição à gema de ovo total, observamos pela avaliação das tabelas 1.32 e 1.37 que ocorreu diferença estatística entre a gema de ovo e a lipoproteína de baixa densidade, sendo a gema de ovo superior as lipoproteínas para motilidade e vigor espermático, porém, entre as diferentes concentrações de lipoproteínas utilizadas não foram identificados resultados significativos, independente da curva de congelamento utilizada.

Tabela 1.32: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, pelo teste de termo resistência, do sêmen de 7 garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1.

% LBD	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
0	16,95 a	13,33 a	1,98 a
5	14,13 b	10,56 b	1,67 b
10	14,92 ab	11,83 ab	1,80 ab
20	14,89 ab	11,56 ab	1,81 ab

Curva 1: congelamento a 3 cm do vapor de N₂; Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si, médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($\alpha < 0,05$).

A avaliação das tabelas 1.33 e 1.38 nos mostram que, a partir da avaliação inicial, tempo zero, até o tempo de 120 minutos, todos os resultados e intervalos de tempo foram estatisticamente significativos para o teste de termo resistência, tendo as duas curvas de congelamento apresentado resultados semelhantes para os parâmetros avaliados. A partir do tempo de 120 minutos não ocorreu mais diferenças estatísticas significativas. Estes resultados nos mostraram que o teste de termo resistência, realizado neste experimento foi uma ferramenta para a avaliação seminal até o tempo de 120 minutos.

Tabela 1.33: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, pelo teste de termo resistência, do sêmen de 7 garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1.

Tempo	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
0	37,32 a	32,05 a	3,30 a
30	30,38 b	24,89 b	3,06 ab
60	22,50 c	17,14 c	2,64 bc
90	16,45 d	12,09 d	2,21 cd
120	11,79 e	8,23 e	1,80 de
150	8,57 ef	5,63 ef	1,38 ef
180	5,71 fg	3,68 fg	0,95 fg
210	3,13 gh	1,86 fg	0,67 gh
240	1,16 h	0,79 g	0,32 h

Curva 1: congelamento a 3 cm do vapor de N₂; Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si, médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($\alpha < 0,05$).

As tabelas 1.34, 1.35, 1.39 e 1.40 apresentam os resultados médios de motilidade total e motilidade progressiva respectivamente para o desdobramento do crioprotetor utilizado no congelamento pelo teste de termo resistência. De acordo com os resultados podemos avaliar que até o tempo de 120 minutos para a motilidade total e até 90 minutos para a motilidade progressiva, ocorreu diferença significativa para o crioprotetor utilizado, onde a dimetilformamida foi superior ao glicerol nas duas curvas de congelamento.

Tabela 1.34: Valores médios de motilidade total pelo teste de termo resistência, do sêmen de 7 garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1 quando realizado o desdobramento de crioprotetor dentro de tempo e vice versa

Tempo	Crioprotetor	
	Glicerol	Dimetilformamida
0	31,43 a A	43,21 b A
30	24,86 a B	35,89 b B
60	18,39 a C	26,61 b C
90	13,25 a CD	19,64 b D
120	9,64 a DE	13,93 b DE
150	7,14 a DEF	10,00 a EF
180	4,82 a EF	6,61 a FG
210	2,68 a F	3,57 a G
240	0,89 a F	1,43 a G

Curva 1: congelamento a 3 cm do vapor de N₂; Teste utilizado: Tukey. Médias seguidas por diferentes letras minúscula diferem entre si nas linhas, médias seguidas por diferentes letras maiúscula diferem entre si nas colunas ($\alpha < 0,05$).

Tabela 1.35: Valores médios de motilidade progressiva pelo teste de termo resistência, do sêmen de 7 garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 1 quando realizado o desdobramento de crioprotetor dentro de tempo e vice versa

Tempo	Crioprotetor	
	Glicerol	Dimetilformamida

0	26,25 a A	37,86 b A
30	19,29 a B	30,50 b B
60	13,04 a C	21,25 b C
90	9,39 a CD	14,79 b D
120	6,96 a DE	9,50 a DE
150	4,71 a DEF	6,54 a EF
180	2,96 a EF	4,39 a EF
210	1,43 a EF	2,29 a F
240	0,64 a F	0,93 a F

Curva 1: congelamento a 3 cm do vapor de N₂; Teste utilizado: Tukey. Médias seguidas por diferentes letras minúscula diferem entre si nas linhas, médias seguidas por diferentes letras maiúscula diferem entre si nas colunas ($\alpha < 0,05$).

Tabela 1.36: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, do sêmen de 7 garanhões, obtidos pelo teste de termo resistência, pós-descongelamento utilizando a curva 2

Crioprotetor	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
Glicerol	12,85 a	9,60 a	1,74 a
Dimetilformamida	17,70 b	14,09 b	1,91 b

Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C daí -20°C/min até -120°C. Teste utilizado: Tukey. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si ($\alpha < 0,05$).

Tabela 1.37: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, do sêmen de 7 garanhões, obtidos pelo teste de termo resistência, pós-descongelamento utilizando a curva 2

% LBD	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
0	17,04 a	13,40 a	2,01 a
5	14,17 b	10,56 b	1,67 b
10	15,00 ab	11,88 ab	1,81 ab
20	14,89 ab	11,52 ab	1,81 ab

Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C daí -20°C/min até -120°C. Teste utilizado: Tukey. Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si ($\alpha < 0,05$).

Tabela 1.38: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático, pelo teste de termo resistência, do sêmen de 7 garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2

Tempo	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
0	37,27 a	32,05 a	3,30 a
30	30,38 b	24,89 b	3,05 ab
60	22,48 c	17,14 c	2,64 bc
90	16,45 d	11,96 d	2,18 cd
120	12,23 de	8,55 de	1,91 d
150	8,75 ef	5,71 ef	1,39 e
180	5,54 fg	3,59 fg	0,93 ef
210	3,21 g	1,89 fg	0,70 fg
240	1,16 g	0,79 g	0,30 g

Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C daí -20°C/min até -120°C. Teste utilizado: Tukey. Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si, médias seguidas por letras diferentes diferem entre si, ($\alpha < 0,05$).

Tabela 1.39: Valores médios de motilidade total pelo teste de termo resistência, do sêmen de 7 garanthões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2 quando realizado o desdobramento de crioprotetor dentro de tempo e vice versa

Tempo	Crioprotetor	
	Glicerol	Dimetilformamida
0	31,32 a A	43,21 b A
30	24,86 a B	35,89 b B
60	18,36 a C	26,61 b C
90	13,25 a CD	19,64 b D
120	10,71 a DE	13,75 a DE
150	7,68 a DEF	9,82 a EF
180	5,54 a EFG	5,59 a FG
210	3,04 a FG	3,39 a G
240	0,89 a G	1,43 a G

Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C daí -20°C/min até -120°C. Médias seguidas de diferente letra minúscula diferem entre si nas linhas, médias seguidas de diferente letra maiúscula diferem entre si nas colunas ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey.

Tabela 1.40: Valores médios de motilidade progressiva pelo teste de termo resistência, do sêmen de 7 garanthões, obtidos pós-descongelamento utilizando a curva 2 quando realizado o desdobramento de crioprotetor dentro de tempo e vice versa

Tempo	Crioprotetor	
	Glicerol	Dimetilformamida
0	26,25 a A	37,86 b A
30	19,29 a B	20,30 b B
60	13,04 a C	21,25 b C
90	9,39 a CD	14,54 b D
120	7,68 a CDE	9,34 a DE
150	5,00 a DEF	6,43 a EF
180	3,50 a EF	3,68 a EF
210	1,61 a F	2,18 a F
240	0,64 a F	0,93 a F

Curva 2: queda de -5°C/min até 5°C daí -20°C/min até -120°C. Médias seguidas de diferente letra minúscula diferem entre si nas linhas, médias seguidas de diferente letra maiúscula diferem entre si nas colunas ($\alpha < 0,05$). Teste utilizado: Tukey.

Furst et al. (2005), durante TTR, verificaram diferença estatística para a motilidade e o vigor espermático em relação ao resfriamento prévio do sêmen antes da etapa de criopreservação

propriamente, enquanto Osório (2006) não encontrou diferença estatística para o TTR, quando comparou diferentes formas de adição do crioprotetor e diferentes curvas de resfriamento e congelamento.

2.5. CONCLUSÕES

As lipoproteínas de baixa densidade, utilizadas nas concentrações de 10 e 20% mostraram ser tão eficientes em proteger os espermatozóides quanto à gema de ovo integral usada no meio INRA 82.

A curva lenta de congelamento foi superior a curva rápida para os parâmetros motilidade total, motilidade progressiva, vigor espermático, teste hiposmótico e teste de termo resistência, independente do crioprotetor utilizado.

A dimetilformamida foi superior ao glicerol, nas duas curvas de congelamento, nas avaliações de motilidade total, motilidade progressiva, morfologia espermática, teste hiposmótico, número de espermatozóides lesados e teste de termo resistência.

ANEXOS

Tabela 1.1A: Análise de variância para Motilidade Total, Motilidade Progressiva e Vigor espermático obtidos pós-descongelamento para a curva 1

FV	GL	Motilidade		Motilidade Progressiva		Vigor	
		Total				QM	F
		QM	F	QM	F		
Garanhão	6	963,2857		0,2857		970,5357	
Crioprotetor	1	1944,6429	29,70**	0,0179	0,08 ^{n.s.}	1886,1607	27,00**
% LBD	3	17,2619	0,26 ^{n.s.}	0,1131	0,49 ^{n.s.}	17,1131	0,25 ^{n.s.}
Criop. X %LBD	3	5,3571	0,08 ^{n.s.}	0,0179	0,08 ^{n.s.}	14,7321	0,21 ^{n.s.}
Erro	42	65,4762		0,2313		69,8554	
CV		21,68%		26,07%		14,56%	
Média		37,3214		32,0536		3,3036	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F. CV = coeficiente de variação. Criop = Crioprotetor.

Tabela 1.2A: Análise de variância para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático obtido pós-descongelamento para a curva 2

FV	GL	Motilidade		Motilidade Progressiva		Vigor	
		total				QM	F
		QM	F	QM	F		
Garanhão	6	1228,5714		1,1548		1276,7857	
Crioprotetor	1	1944,6429	45,02**	0,1607	0,88 ^{n.s.}	1944,6429	44,93**
% LBD	3	44,0476	1,02 ^{n.s.}	0,1131	0,62 ^{n.s.}	53,5714	1,24 ^{n.s.}
Criop. X %LBD	3	19,6429	0,46 ^{n.s.}	0,1607	0,88 ^{n.s.}	17,2619	0,40 ^{n.s.}
Erro	42	43,1973		0,1820		43,2823	
CV		13,34%		14,98%		11,88%	
Média		49,2857		43,9286		3,5893	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F. Criop = Crioprotetor.

Tabela 1.3A: Análise de variância para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático obtida para as curvas 1 e 2 em conjunto

FV	GL	Motilidade Total		Motilidade Progressiva		Vigor	
		QM	F	QM	F	QM	F
		Garanhão	6	1888,9881		1,0922	
Curva	1	4008,0357	57,83**	2,2857	10,58**	3948,4375	54,60**
Crioprotetor	1	3889,2857	56,12**	0,1429	0,66 ^{n.s.}	3830,5804	52,97**
% LBD	3	45,5357	0,66 ^{n.s.}	0,1071	0,50 ^{n.s.}	43,0804	0,60 ^{n.s.}
Curva X Crioprotetor	1	0,0014	0,00 ^{n.s.}	0,0357	0,17 ^{n.s.}	0,2232	0,00 ^{n.s.}
Curva X %LBD	3	15,7738	0,23 ^{n.s.}	0,1190	0,55 ^{n.s.}	27,6042	0,38 ^{n.s.}
Crioprotetor X %LBD	3	17,2619	0,25 ^{n.s.}	0,0714	0,33 ^{n.s.}	22,8423	0,32 ^{n.s.}

Curva X Crioprotetor X %LBD	3	7,7381	0,11 ^{n.s.}	0,1071	0,50 ^{n.s.}	9,1518	0,13 ^{n.s.}
Erro	90	69,3056		0,2161		72,3115	
Coefficiente de Variação		19,22%		22,38%		13,49%	
Média Geral		43,3036		37,9911		3,4464	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F. CV = coeficiente de variação.

Tabela 1.4A: Análise de variância para Morfologia obtida pós-descongelamento para a curva 1

FV	GL	Morfologia	
		QM	F
Garanhão	6	308,7679	
Crioprotetor	1	185,7857	9,52**
% LBD	3	23,0714	1,18 ^{n.s.}
Crioprotetor X %LBD	3	32,1190	1,65 ^{n.s.}
Erro	42	19,5094	
Coefficiente de Variação			6,63%
Média			66,6071

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela 1.5A: Análise de variância para Morfologia obtida pós-descongelamento para a curva 2

FV	GL	Morfologia	
		QM	F
Garanhão	6	675,1012	
Crioprotetor	1	3,5000	0,26 ^{n.s.}
% LBD	3	16,8333	1,27 ^{n.s.}
Crioprotetor X %LBD	3	22,5476	1,70 ^{n.s.}
Erro	42	13,3121	
Coefficiente de Variação			5,52%
Média			66,1071

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela 1.6A: Análise de variância para Morfologia obtida pós-descongelamento para as curvas 1 e 2 em conjunto

FV	GL	Morfologia	
		QM	F
Garanhão	6	914,5357	
Curva	1	7,0000	0,35 ^{n.s.}
Crioprotetor	1	120,1429	6,03*
% LBD	3	13,1190	0,66 ^{n.s.}
Curva X Crioprotetor	1	69,1429	3,47 ^{n.s.}
Curva X %LBD	3	26,7857	1,34 ^{n.s.}
Crioprotetor X %LBD	3	24,6905	1,24 ^{n.s.}

Curva X Crioprotetor X %LBD	3	29,9762	1,50 ^{n.s.}
Erro	90	19,9389	
Coeficiente de Variação		6,73%	
Média Geral		66,3571	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela 1.7A: Análise de variância para teste hiposmótico obtido pós-descongelamento para a curva 1

FV	GL	HO	
		QM	F
Garanhão	6	463,4524	
Crioprotetor	1	236,1607	4,21*
% LBD	3	34,5893	0,62 ^{n.s.}
Crioprotetor X %LBD	3	93,5417	1,67 ^{n.s.}
Erro	42	56,0374	
Coeficiente de Variação		25,00%	
Média		29,9464	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela 1.8A: Análise de variância para teste hiposmótico obtido pós-descongelamento para curva 2

FV	GL	HO	
		QM	F
Garanhão	6	346,8631	
Crioprotetor	1	117,1607	3,51 ^{n.s.}
% LBD	3	14,0655	0,42 ^{n.s.}
Crioprotetor X %LBD	3	43,8750	1,31 ^{n.s.}
Erro	42	33,4141	
Coeficiente de Variação		16,24%	
Média		35,5893	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela 1.9A: Análise de variância para teste hiposmótico obtida pós-descongelamento para as curvas 1 e 2 em conjunto

FV	GL	HO	
		QM	F
Garanhão	6	394,0774	
Curva	1	891,5714	12,83**
Crioprotetor	1	343,0000	4,94*
% LBD	3	35,8452	0,52 ^{n.s.}
Curva X Crioprotetor	1	10,3214	0,15 ^{n.s.}
Curva X %LBD	3	12,8095	0,17 ^{n.s.}
Crioprotetor X %LBD	3	84,7143	1,22 ^{n.s.}
Curva X Crioprotetor X %LBD	3	52,7024	0,76 ^{n.s.}

Erro	90	69,4933
Coefficiente de Variação		25,44%
Média Geral		32,7679

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela 1.10A: Análise de variância para íntegros, semilesados e lesados obtidos pós-descongelamento para a curva 1

FV	GL	Íntegros		Semilesados		Lesados	
		QM	F	QM	F	QM	F
Garanhão	6	2012,0595		84,8631		2044,7857	
Crioprotetor	1	787,5000	19,61**	1,7857	0,36 ^{n.s.}	714,2857	18,91**
% LBD	3	74,1429	1,85 ^{n.s.}	3,9524	0,80 ^{n.s.}	81,2381	2,15 ^{n.s.}
Criop. X %LBD	3	31,9286	0,80 ^{n.s.}	0,7857	0,16 ^{n.s.}	40,9524	1,08 ^{n.s.}
Erro	42	40,1616		4,9583		37,7653	
CV		11,61%		30,87%		15,90%	
Média		52,9286		7,2143		39,8571	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F. Criop = crioprotetor, CV = coeficiente de variação.

Tabela 1.11A: Análise de variância para íntegros, semilesados e lesados obtida pós-descongelamento para a curva 2

FV	GL	Íntegros		Semilesados		Lesados	
		QM	F	QM	F	QM	F
Garanhão	6	1402,0595		252,0774		1286,6964	
Crioprotetor	1	123,0179	3,64 ^{n.s.}	4,5714	0,41 ^{n.s.}	56,0000	1,66 ^{n.s.}
% LBD	3	106,1607	3,14*	9,4762	0,86 ^{n.s.}	48,9048	1,45 ^{n.s.}
Criop. X %LBD	3	29,2560	0,86 ^{n.s.}	10,5238	0,95 ^{n.s.}	37,9524	1,13 ^{n.s.}
Erro	42	33,8418		11,0638		33,7304	
Coefficiente de Variação		10,78%		33,50%		16,01%	
Média		53,9821		9,9286		36,2857	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F. Criop. = crioprotetor, CV = coeficiente de variação.

Tabela 1.12A: Análise de variância para íntegros, semilesados e lesados obtida pós-descongelamento para as curvas 1 e 2 em conjunto

FV	GL	Íntegros		Semilesados		Lesados	
		QM	F	QM	F	QM	F
Garanhão	6	3390,2857		204,3036		3160,8006	
Curva	1	31,0804	0,84 ^{n.s.}	206,2857	12,63**	357,1429	8,18**
Crioprotetor	1	715,0804	19,23**	0,3214	0,02 ^{n.s.}	631,7500	14,46**
% LBD	3	159,8661	4,30**	8,8333	0,54 ^{n.s.}	83,9524	1,92 ^{n.s.}
Curva X Criop.	1	122,2232	3,29 ^{n.s.}	6,0357	0,37 ^{n.s.}	211,7500	4,85*
Curva X %LBD	3	27,5327	0,74 ^{n.s.}	4,5952	0,28 ^{n.s.}	39,0952	0,90 ^{n.s.}
Criop. X %LBD	3	26,1042	0,70 ^{n.s.}	6,9643	0,43 ^{n.s.}	22,1310	0,51 ^{n.s.}

Curva X Criop. X %LBD	3	44,1042	1,19 ^{n.s.}	4,3452	0,27 ^{n.s.}	47,7500	1,09 ^{n.s.}
Erro	90	37,1873		16,3363		43,6800	
Coefficiente de Variação		11,41%		47,15%		17,36	
Média Geral		53,4553		8,5714		38,0714	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F. Criop. = crioprotetor

Tabela1.13A: Análise de variância para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático para curva 1.

FV	GL	Motilidade Total		Motilidade Progressiva		Vigor	
		QM	F	QM	F	QM	F
Repetição	6	2885,2130		2059,3400		30,9114	
Crioprotetor	1	3552,0714	61,25**	2924,1984	61,84**	10,2857	16,03**
% LBD	3	184,5926	3,18*	165,2751	3,50*	2,0238	3,15**
Tempo	8	8840,7103	152,44**	6630,7490	140,23**	63,7416	99,32**
Crioprotetor X %LBD	3	63,5212	1,10 ^{n.s.}	49,3254	1,04 ^{n.s.}	0,4497	0,70 ^{n.s.}
Crioprotetor x Tempo	8	255,7054	4,41**	281,3591	5,95**	0,4063	0,63 ^{n.s.}
%LBD X Tempo	24	14,0509	0,24 ^{n.s.}	13,7900	0,29 ^{n.s.}	0,2634	0,41 ^{n.s.}
Crioprotetor X %LBD X Tempo	24	20,6134	0,36 ^{n.s.}	11,4266	0,24 ^{n.s.}	0,2667	0,42 ^{n.s.}
Erro	426	57,9957		47,2843		0,6418	
Coefficiente de Variação		50,03		58,19		44,17	
Média		15,2222		11,8175		1,8135	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela1.14A: Análise de variância para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático para curva 2.

FV	GL	Motilidade Total		Motilidade Progressiva		Vigor	
		QM	F	QM	F	QM	F
Repetição	6	2833,9431		2040,0403		29,38,76	
Crioprotetor	1	2962,8651	50,61**	2538,0179	53,31**	3,6687	5,56*
% LBD	3	191,8228	3,28*	175,5417	3,69*	2,4782	3,76*
Tempo	8	8794,6116	150,22**	6612,5035	138,90**	63,5288	96,25**
Crioprotetor X %LBD	3	34,5212	0,59 ^{n.s.}	34,1396	0,72 ^{n.s.}	0,1766	0,27 ^{n.s.}
Crioprotetor x Tempo	8	305,8070	5,22**	312,6652	6,57**	0,2222	0,34 ^{n.s.}
%LBD X Tempo	24	15,6546	0,27 ^{n.s.}	14,3943	0,30 ^{n.s.}	0,4157	0,63 ^{n.s.}
Crioprotetor X %LBD X Tempo	24	19,5881	0,34 ^{n.s.}	12,5309	0,26 ^{n.s.}	0,2004	0,30 ^{n.s.}
Erro	426	58,5434		47,6051		0,6600	
Coefficiente de Variação		50,09		58,26		44,38	
Média		15,2738		11,84		1,8307	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela 1.15A – Composição do Meio diluidor INRA 82 modificado

Componentes	Quantidade
Glicose anidra (g)	25
Lactose, 1H ₂ O (g)	1,5
Raffinose, 5 H ₂ O (g)	1,5
Citrato de Sódio, 2 H ₂ O (g)	0,25
Citrato de Potássio, 1 H ₂ O (g)	0,41
HEPES (g)	4,76
Sulfato de gentamicina (mg)	50
Penicilina G (UI)	50.000
Leite desnatado UHT (mL)	500
Águaqsp (mL)	250

INRA 82 modificado (Palmer et al, 1984), - Fórmula para 1 litro

Tabela 1.16A - Osmolaridade e pH final dos meios diluidores de sêmen de sete garanhões

Diluidores	Osmolaridade	pH
Tratamento 1	1086 mOsm	6,78
Tratamento 2	1101 mOsm	6,39
Tratamento 3	1125 mOsm	6,34
Tratamento 4	1074 mOsm	6,34
Tratamento 5	1109 mOsm	6,29
Tratamento 6	1138 mOsm	6,46
Tratamento 7	1176 mOsm	6,52
Tratamento 8	1117 mOsm	6,50

Tratamento 1: meio INRA 82, com 5% de glicerol (controle). **Tratamento 2:** meio INRA 82, com 5% de glicerol e 5% de LBD. **Tratamento 3:** meio INRA 82, com 5% de glicerol e 10% de LBD. **Tratamento 4:** meio INRA 82, com 5% de glicerol e 20% de LBD. **Tratamento 5:** meio INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 5% de LBD. **Tratamento 6:** meio INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 10% de LBD. **Tratamento 7:** meio INRA 82, com 5% de dimetilformamida e 20% de LBD. **Tratamento 8:** meio INRA 82, com 5% de dimetilformamida (controle).

3. EXPERIMENTO II

Efeito da forma de adição da dimetilformamida e da variação de osmolaridade inicial do meio diluidor base sobre a viabilidade dos espermatozóides eqüinos criopreservados

3.1 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito da forma de adição da dimetilformamida na viabilidade dos espermatozóides eqüinos criopreservados em meio base contendo lipoproteínas de baixa densidade,
- Estudar o efeito da mudança de osmolaridade do meio diluidor base antes da adição do crioprotetor sobre a viabilidade dos espermatozóides eqüinos criopreservados.

3.2 JUSTIFICATIVA

O sucesso na criopreservação do espermatozóide eqüino é dependente de uma complexa interação entre os meios diluidores, os protocolos de resfriamento, congelamento e o descongelamento. Considerando que a funcionalidade da membrana plasmática é um dos principais requisitos para que ocorra a fertilização, as pesquisas envolvendo crioprotetores, osmolaridade, protocolos de congelamento e testes para avaliar sua funcionalidade e sua correlação com a viabilidade espermática ganharam maior importância.

Desde a descoberta da sua propriedade crioprotetora, o glicerol tem sido o crioprotetor mais utilizado para o congelamento de espermatozóides da maioria dos animais domésticos (Vidament, 1997). Apesar da sua utilização rotineira, o uso do glicerol como crioprotetor para o congelamento é apontado como um dos fatores causadores de baixas taxas de motilidade espermática pós-descongelamento como também das baixas taxas de fertilidade para a espécie eqüina. Trabalhos (Pace & Sullivan, 1975; Gilmore et al., 1995) demonstraram que a verdadeira toxicidade do glicerol é devido ao estresse osmótico, uma vez que o glicerol penetra as membranas celulares mais facilmente que outros crioprotetores. Alvarenga e colaboradores (2005) relataram que para um crioprotetor ser eficiente ele precisa apresentar: baixo peso molecular, habilidade para atravessar as membranas plasmáticas das células, alta solubilidade em soluções aquosas eletrolíticas e baixa toxicidade.

Alvarenga et al. (2005), reportaram também que as amidas possuem peso molecular mais baixo quando comparado ao glicerol e isto seria favorável para o processo da criopreservação, pois estas induziriam um menor estresse osmótico. Tentativas de minimizar o estresse osmótico durante o processo de criopreservação incluem a utilização de crioprotetores alternativos, com baixo peso molecular e que atravessam a membrana com maior facilidade, a incorporação de substâncias aos meios diluidores que aumentam a estabilização das membranas espermáticas, como por exemplo o colesterol e as ciclodextrinas (Squires, 2005), bem como a adição do crioprotetor ao meio diluidor em diferentes etapas (Wessel & Ball, 2004; Osório et al., 2006; Juliani et al., 2007).

Diversos trabalhos com sêmen equino congelado demonstraram uma melhora significativa na qualidade do sêmen mediante o uso da dimetilformamida como agente crioprotetor quando comparado ao glicerol (Alvarenga et al., 2000; Medeiros et al., 2003; Moffet et al., 2003). Segundo Alvarenga et al. (2005), a utilização das amidas como crioprotetores penetrantes nos extensores seminais para o sêmen equino proporciona um incremento na motilidade espermática pós-descongelamento e uma melhor preservação da integridade das membranas plasmáticas quando comparado ao glicerol; isto possibilita o congelamento de sêmen de garanhões classificados como maus congeladores de sêmen. No presente experimento ficou evidente, corroborando com outras pesquisas (Alvarenga et al., 2002; Medeiros et al., 2003; Juliani et al., 2004), que já haviam relatado sobre a qualidade da dimetilformamida, que a dimetilformamida protege melhor os espermatozoides equinos, quando usada com o meio INRA 82, do que o glicerol.

As variações de osmolaridade durante o processo de criopresevação têm sido pesquisadas em diversos estudos. Trabalhos recentes, (Gilmore et al., 1996; Lagares et al., 1999; Melo & Henry, 1999; Lagares et al., 2000; Guthrie et al., 2002; Agca et al., 2002; Landim-Alvarenga et al., 2005; Melo et al., 2005) em diferentes espécies, têm proporcionado novas informações relativa aos limites de tolerância osmótica e dos efeitos da rápida adição e remoção dos agentes crioprotetores sobre os espermatozoides. De acordo com estes relatos, a rápida adição do crioprotetor e as repetidas mudanças de osmolaridade que a células espermáticas passam durante o processo de congelamento e do descongelamento podem resultar em significativa perda da integridade funcional, como o declínio na motilidade e no potencial da membrana mitocondrial dos espermatozoides, ou ainda, provocar a morte celular sem alteração da integridade da membrana plasmática.

Os estudos das variações de osmolaridade nas diferentes espécies, como nos espermatozoides humanos (Gilmore et al., 1995, 1997), do varrão (Gilmore et al., 1998), de bovinos (Watson et al., 1992; Liu & Foot, 1998), do cão (Oliveira et al., 2006), de camundongos (Willoughby et al., 1996) e de equinos (Melo & Henry, 1999; Lagares et al., 1998, 1999, 2000; Ball & Vo, 2001; Crabo, 2001; Pommer et al., 2002; Papa et al., 2004), têm demonstrando ser esta uma área que merece maior atenção no processo de congelamento de espermatozoides.

A avaliação desses trabalhos e os atuais índices de fertilidade para a espécie equina indicam que ainda não chegamos a uma técnica ideal de congelamento para o sêmen equino, e por isto, estudos complementares são necessários para obter uma curva e um meio extensor padrão para a espécie. É importante ressaltar que a curva de eleição pode estar na dependência da composição do meio diluidor, principalmente das substâncias crioprotetoras, que provocam grande alteração na osmolaridade do meio.

Baseado na literatura, nas considerações acima expostas e considerando os resultados apresentados no experimento I, os objetivos deste segundo experimento foram tentar aprimorar os resultados obtidos no experimento 1 buscando estudar o efeito da forma de adição da dimetilformamida, do ajuste da osmolaridade do meio base sem crioprotetor em associação com a utilização de lipoproteínas de baixa densidade no congelamento de sêmen equino.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis garanhões da raça Mangalarga Marchador, de fertilidade comprovada, com idade variando entre 4 a 8 anos, todos submetidos a iguais condições de criação. Os animais foram selecionados com base no histórico clínico e em exames andrológicos. Somente foram utilizados ejaculados para congelamento que apresentavam motilidade espermática progressiva, igual ou superior a 60% e concentração maior ou igual a 60 milhões de espermatozóides por mL, seguindo os padrões estipulados para a espécie equina, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). As avaliações dos parâmetros espermáticos seguiram os mesmos critérios descritos para o experimento I.

Após a seleção, os animais foram esgotados diariamente durante sete dias até a estabilização das reservas extragonadais. Dois dias após o equilíbrio destas reservas extragonadais iniciou-se a coleta de sêmen para o congelamento. O sêmen foi coletado utilizando o método da vagina artificial de fundo fechado (modelo Hannover), utilizando como manequim uma égua contida em cio natural ou induzida. Posteriormente, o sêmen era filtrado e a porção livre de gel era avaliada quanto a suas características físicas e pH.

Imediatamente após avaliação da motilidade total, motilidade progressiva e do vigor espermático, o sêmen foi diluído na proporção de 1:1 com o diluidor base INRA 82 (Palmer, 1984) sem crioprotetor, previamente aquecido em banho-maria à temperatura de 37°C. Após a diluição o sêmen foi mantido à temperatura ambiente durante 10 minutos. Na seqüência o sêmen foi alíquotado em oito tubos, representando os oito tratamentos, todos com um mesmo volume, para ser submetida ao processo de centrifugação a 400 g por 12 minutos. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspendido usando-se o meio diluidor base INRA 82, sem crioprotetor, até completar um volume de 2 mL. A diluição final foi realizada para obter-se uma concentração de 100×10^6 espermatozóides/mL. O volume do crioprotetor, a dimetilformamida, a ser adicionado foi calculado de modo a obter uma concentração final de 5%.

Para a extração das lipoproteínas de baixa densidade foram utilizados ovos frescos de galinha. A gema do ovo foi separada da clara e fracionada de acordo com o método descrito por McBee & Cotteril, (1979). A extração final das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo foi realizada por diálise seguindo o protocolo descrito por Moussa et al., (2002). Os meios utilizados foram preparados em parceria com a empresa Nutricell – Nutrientes Celulares Ltda¹ e previamente testados em laboratório quanto à osmolaridade e pH. Para a determinação da osmolaridade utilizou-se o Laboratório de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da UFMG, onde as avaliações foram realizadas em aparelho de precisão (VAPRO – Vapor Pressure Osmometer, Model 5520 – WESCOR - Utah, USA).

Foram testadas duas formas de adição da dimetilformamida:

- Tempo 1, adição da dimetilformamida a 5% incorporada ao meio de congelamento em uma única etapa;
- Tempo 2, adição da décima parte da dimetilformamida a cada 1 minutos no tempo total de dez minutos para obter na diluição final a concentração de 5 % de dimetilformamida.

Oito tratamentos foram testados na mudança na forma de disponibilização de proteínas de baixa densidade; mudanças na forma de adição da dimetilformamida, etapa única ou fracionada e variação da osmolaridade inicial do meio base conforme descrito nos tratamentos apresentados a seguir:

Tratamentos:

Tratamento 1: INRA 82, com 20% de LBD a 300mOsmol/L e 5% de DMF;

Tratamento 2: INRA 82, com 20% de LBD a 400mOsmol/L e 5% de DMF;

Tratamento 3: INRA 82, com 2% de gema ovo a 300mOsmol/L e 5% de DMF;

Tratamento 4: INRA 82, com 2% de gema ovo a 400mOsmol/L e 5% de DMF;

Tratamento 5: INRA 82, com 20% de LBD a 300mOsmol/L e 5% de DMF;

Tratamento 6: INRA 82, com 20% de LBD a 400mOsmol/L e 5% de DMF;

Tratamento 7: INRA 82, com 2% de gema ovo a 300mOsmol/L e 5% de DMF;

Tratamento 8: INRA 82, com 2% de gema ovo a 400mOsmol/L e 5% de DMF.

Os tratamentos numerados de 1 a 4 receberam adição da dimetilformamida em uma única etapa e os tratamentos de 5 a 8 receberam adição da dimetilformamida de forma fracionada conforme descrito acima.

Todas as amostras foram mantidas a temperatura ambiente durante o período de adição fracionada do crioprotetor. Nas amostras onde ocorreu a adição em uma única etapa esta ocorreu no final do período de dez minutos usados para a adição fracionada. Baseado nos resultados do experimento I utilizou-se o congelamento lento para todos os tratamentos. O início do resfriamento, com posterior congelamento ocorreu em todas as amostras após os dez minutos requeridos para a adição fracionada. Para as etapas de resfriamento e congelamento utilizou-se de uma Máquina Computadorizada - Modelo TK 2000 – Tekanon, Nutricell Nutrientes Celulares Ltda. O resfriamento foi realizado a taxa de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, até a temperatura de 5°C . Logo depois de finalizada a etapa de resfriamento iniciou-se a etapa de congelamento, agora na taxa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até atingir -120°C . Em seguida as palhetas foram submersas e estocadas em nitrogênio líquido até a avaliação das amostras.

O descongelamento das amostras foi realizado submergindo as palhetas em banho-maria a 52°C durante 10 segundos, seguido de imersão em banho-maria a 37°C por 30 segundos.

Após o descongelamento as amostras foram submetidas aos testes de avaliação de motilidade total, motilidade progressiva, vigor espermático, morfologia espermática, teste de fluorescência e teste hiposmótico, como descrito no experimento I.

Para a análise estatística foi realizada uma análise de variância considerando o delineamento em blocos casualizados em esquema fatorial: 2 fontes de lipoproteínas de baixa densidade x 2 osmolaridades do meio base sem crioprotetor x 2 formas de adição do crioprotetor, considerando os ganhões como blocos.

O modelo estatístico empregado foi:

$$y_{ijkl} = \mu + b_k + s_i + o_j + f_k + (so)_{ij} + (of)_{ik} + (sf)_{jk} + (sof)_{ijk} + e_{ijkl}$$

Em que:

μ : média geral;

b_k : efeito do bloco, $k = 1, 2, \dots, 6$;

s_i : efeito da substância $i = 1, 2$;

o_j : efeito da osmolaridade, $j = 1, 2$;

f_k : efeito da forma de adição, $k = 1, 2$;

$(so)_{ij}$: efeito da interação substância x osmolaridade;

$(sf)_{ik}$: efeito da interação substância x forma de adição;

$(of)_{jk}$: efeito da interação osmolaridade x forma de adição;

$(sof)_{ijk}$: efeito da interação substância x osmolaridade x forma de adição;

e_{ijkl} : erro experimental, tal que $e_{ijk} \cap NID(\mu, \sigma^2)$

As médias obtidas para curva, substâncias e porcentagens de LBD foram analisadas empregando-se o teste de Tukey ($\alpha > 0,05$).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a análise de variância referente às avaliações de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermática estão apresentados na tabela 2.1A (em anexo). As análises desses valores nos mostram que existem diferenças significativas para os parâmetros motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático para a substância, lipoproteína ou gema de ovo pura, utilizada no meio crioprotetor base. Para a motilidade total a diferença estatística encontrada está na substância base, gema de ovo ou lipoproteína da geam do ovo na concentração de 20% utilizada no meio diluidor, na osmolaridade e entre a substância utilizada no meio diluidor e formas de adição do crioprotetor. Para a motilidade progressiva além da

substância utilizada, existe diferença significativa entre substância e osmolaridade do meio inicial.

Os resultados médios referentes aos resultados de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático pós-descongelamento, em relação à substância utilizada no meio diluidor base, de 6 gananhões estão representados na tabela 2.1.

Tabela 2.1: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático de seis gananhões, obtidos pós-descongelamento usando gema total ou lipoproteína de baixa densidade

Fonte de lipoproteínas	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
LBD	38,96 a	32,08 a	3,17 a
Gema	49,38 b	44,21 b	3,46 b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste Tukey ($\alpha < 0,05$).

Avaliando os valores desta tabela percebemos que em relação à substância base utilizada no meio diluidor de congelamento, a gema de ovo pura foi superior as lipoproteínas de baixa densidade, utilizada na concentração de 20%, em todos os três parâmetros espermáticos. Vale ressaltar que os valores de motilidades e vigor são similares aos encontrados para a espécie equina em outros estudos (Alvarenga et al., 2000; Meireles et al., 2003; Juliani et al., 2004; Alvarenga et al., 2005; Martin, 2005; Osório et al., 2006; Juliani et al., 2007).

Conforme podemos analisar na tabela 2.2, não foi encontrado diferença estatística para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático em relação às diferentes formas de adição da dimetilformamida. Estes resultados estão em discordância com os relatados apresentados por Fernanda (informação pessoal) e em concordância com os achados de Juliani et al. (2007) que trabalharam com adição fracionada do crioprotetor.

Tabela 2.2: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático do sêmen de seis gananhões, obtidos pós-descongelamento para duas formas de adição da dimetilformamida

Adição	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
Única	42,92 a	38,33 a	3,29 a
Fracionada	45,63 a	38,96 a	3,33 a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($\alpha < 0,05$).

A tabela 2.3, refere-se aos valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático em relação à osmolaridade inicial do meio diluidor base. Conforme podemos observar, não ocorreu diferença significativa nestes parâmetros, independente da osmolaridade inicial do meio diluidor. Papa et al. (2004) também não encontrou diferença estatística na avaliação da motilidade total e motilidade progressiva para diferentes osmolaridades do meio utilizada no congelamento de sêmen de gananhões que apresentavam baixa congelabilidade espermática. Observamos nesse experimento, uma tendência, com os maiores valores numéricos obtidos, quando a osmolaridade inicial do meio diluidor base foi de 400 mOsm/L.

Tabela 2.3: Valores médios de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento utilizando o meio base com duas osmolaridades diferentes

Osmolaridade	Motilidade Total	Motilidade Progressiva	Vigor
300 (mOsmol/L)	42,71 a	35,83 a	3,21 a
400 (mOsmol/L)	45,63 a	40,46 a	3,42 a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste Tukey ($\alpha < 0,05$).

As tabelas 2.4 e 2.6 apresentam os valores do desdobramento da substância base em relação à osmolaridade inicial do meio e vice versa, para os parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva, respectivamente. A discussão destas tabelas em conjunto deve-se ao fato de que ambos os parâmetros apresentaram comportamento semelhante. Verificamos nestas tabelas que a superioridade ($p < 0,05$) da gema integral sobre as lipoproteínas de baixa densidade foi observada somente dentro da osmolaridade inicial de 300 mOsmo/L do meio diluidor base, ou seja, se utilizarmos a gema de ovo como meio base, não existe diferença estatística, para a motilidade total e motilidade progressiva, entre utilizarmos 300 ou 400 mOsmo/L como osmolaridade inicial. Avaliando os tratamentos com as lipoproteínas observamos que, a osmolaridade inicial de 400 mOsmol/L do meio base foi superior ($p < 0,05$) a de 300 mOsmol/L. É possível que na gema pura existam componentes ou substâncias que oferecem proteção adicional ao espermatozóide, e que, durante a extração das lipoproteínas essas substâncias seriam excluídas ou mesmo inativadas. O aumento da osmolaridade do meio base quando do uso de lipoproteína de baixa densidade parece ter exercido um efeito compensatório na proteção espermática expressa pela motilidade pós-descongelamento.

Tabela 2.4: Valores médios de motilidade total, do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado o desdobramento dos valores para substâncias dentro de Osmolaridade

Osmolaridade	Substância	
	LBD	Gema
300 (mOsmol/L)	34,17a A	51,25b A
400 (mOsmol/L)	43,75a B	47,50a A

Médias seguidas de diferente letra minúscula diferem entre si nas linhas, médias seguidas de diferente letra maiúscula diferem entre si nas colunas ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey.

As tabelas 2.5 e 2.7 apresentam os desdobramentos dos valores médios de motilidade total e motilidade progressiva, respectivamente, para substâncias dentro das formas de adição da dimetilformamida e vice versa. Na adição fracionada, observamos que não ocorreu diferença estatística entre a gema pura e a lipoproteína, porém, na adição em única etapa a gema foi superior ($p < 0,05$) à lipoproteína de baixa densidade. Osório (2006) trabalhando com a gema de ovo integral também não encontrou significância para as diferentes formas de adição do crioprotetor.

Tabela 2.5: Valores médios de motilidade espermática total de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado o desdobramento dos valores para substâncias dentro de formas de adição da dimetilformamida

Adição	Substância	
	LBD	Gema

Única	37,08a A	53,75b A
Fracionada	40,83a A	45,00a B

Médias seguidas de diferente letra minúscula diferem entre si nas linhas, médias seguidas de diferente letra maiúscula diferem entre si nas colunas ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey.

Tabela 2.6: Valores médios de motilidade progressiva espermática de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado o desdobramento dos valores para substâncias dentro de osmolaridade (mOsmol/L)

Osmolaridade	Substância	
	LBD	Gema
300 (mOsmol/L)	25,83a A	45,83b A
400 (mOsmol/L)	38,33a B	42,58a A

Médias seguidas de diferente letra minúscula diferem entre si nas linhas, médias seguidas de diferente letra maiúscula diferem entre si nas colunas ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey.

Tabela 2.7: Valores médios de motilidade progressiva, do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado o desdobramento dos valores para substâncias dentro de formas de adição da dimetilformamida

Adição	Substância	
	LBD	Gema
Única	29,58a A	48,33b A
Fracionada	34,58a A	40,08a A

Médias seguidas de diferente letra minúscula diferem entre si nas linhas, médias seguidas de diferente letra maiúscula diferem entre si nas colunas ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey.

Os resultados obtidos para a análise de variância referente às avaliações da morfologia espermática estão apresentados na tabela 2.2A (em anexo). A análise dos dados dessa tabela nos permite concluir que não existem diferenças significativas na frequência de anormalidades espermáticas detectadas pela microscopia de contraste de fase em relação à forma de adição do crioprotetor, a substância base utilizada no meio crioprotetor e a osmolaridade inicial do meio diluidor.

Os resultados médios referentes às avaliações de morfologia espermática pós-descongelamento, em relação à substância utilizada como meio diluidor base, a osmolaridade inicial do meio e a forma de adição da dimetilformamida de seis garanhões após o descongelamento estão apresentados nas tabelas 2.8, 2.9 e 2.10.

Tabela 2.8: Valores médios de morfologia espermática de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para dois meios diferentes

Substância	Espermatozóides normais (%)
LBD	60,46 a
Gema	62,25 a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($\alpha < 0,05$).

Tabela 2.9: Valores médios de morfologia espermática de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes Osmolaridades (mOsmol/L)

Osmolaridade	Espermatozóides normais (%)
300 (mOsmol/L)	61,04 a
400 (mOsmol/L)	61,67 a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem estatisticamente entre si, pelo teste Tukey ($\alpha < 0,05$).

Tabela 2.10: Valores médios de morfologia espermática do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes formas de adição da dimetilformamida

Adição	Morfologia
Única	60,42 a
Fracionada	62,29 a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey.

Conforme observamos nas tabelas 2.8, 2.9 e 2.10, não ocorreram diferença estatística para a morfologia em relação às diferentes variáveis avaliadas neste experimento. A falta de detecção de mudanças na morfologia espermática após o procedimento de criopreservação quando analisado pela microscopia de contraste de fase foi também observado nos estudos de Snoeck, 2003; Cottorello, 2003; Osório, 2006).

Os resultados obtidos para a análise de variância referente às avaliações da integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozóides, avaliados pelo teste hiposmótico (HO) estão apresentados na tabela 2.3A (em anexo). As análises desses resultados nos mostram que existem diferenças significativas entre as substâncias utilizadas no meio crioprotetor base, para a osmolaridade do meio base inicial, para as diferentes formas de adição da dimetilformamida e entre a substância utilizada e a osmolaridade do meio.

Os resultados médios referentes ao teste hiposmótico pós-descongelamento, em relação à substância utilizada como base do meio diluidor, osmolaridade inicial do meio base e formas de adição da dimetilformamida, do sêmen de seis garanhões estão representadas nas tabelas 2.11, 2.12 e 2.13 respectivamente.

Tabela 2.11: Valores médios de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento quando do uso de gema ou lipoproteína de baixa densidade

Substância	HO
LBD	21,29 a
Gema	28,25 b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey. HO = porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico.

Os valores médios do teste hiposmótico encontrados nesse experimento encontram-se dentro dos valores referenciados na literatura (Neild et al., 2000; Dell'Aqua et al, 2002; Pommer et al., 2002; Martin, 2005; Osório et al., 2006; Juliani et al., 2007).

Conforme podemos verificar na tabela 2.11, os resultados apresentados nos mostram uma superioridade ($\alpha < 0,05$) da gema do ovo pura sobre as lipoproteínas para a preservação da integridade funcional da membrana plasmática. No experimento I deste trabalho, quando também comparamos estas duas substâncias, não observamos esta significância. Vale ressaltar que a forma de adição da dimetilformamida e a osmolaridade do meio base eram diferentes, fato que nos remete mais uma vez a pensar que pequenas modificações no protocolo de congelamento podem provocar significativas mudanças na viabilidade dos espermatozóides eqüinos criopreservados. Melo et al. (2005) em experimento com sêmen resfriado eqüino, sugeriram que os meios diluidores à base de gema de ovo preservariam melhor a membrana plasmática do que meios somente a base de leite. Em recente experimento, Martin (2005) utilizando o meio de Martin et al. (1979), não observou diferença estatística, quando substitui a gema de ovo integral por 8% de lipoproteínas de baixa densidade.

Tabela 2.12: Valores médios de teste hiposmótico do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes Osmolaridades

Osmolaridade	HO
300 (mOsmol/L)	20,92 a
400 (mOsmol/L)	28,63 b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey. HO = porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico.

Analisando os resultados da tabela 2.12, verificamos que com 400 mOsmol/L de osmolaridade inicial do meio diluidor base houve uma melhor preservação de funcionalidade da membrana da cauda indicada pelo teste hiposmótico ($\alpha < 0,05$) comparada a aquela obtida com a osmolaridade inicial de 300 mOsmol/L. Segundo Griggers et al. (2002) a osmolaridade ideal do liquido seminal para a máxima motilidade progressiva esta entre 310 e 320 mOsmol/L.

Pommer et al. (2002) avaliando a resistência osmótica dos espermatozóides eqüinos, relataram uma queda na viabilidade espermática em condições hiposmóticas. Ball e Vo (2001) reportaram que, além da redução na motilidade, sob condições hiposmóticas, ocorrem danos a membrana plasmática dos espermatozóides, principalmente na região da peça intermediária. Estes danos são consequência, da rápida entrada de água através da membrana plasmática provocado pela alteração na concentração do soluto durante o congelamento. Watson (2000) relata que os espermatozóides são sensíveis ao estresse osmótico associados à adição dos crioprotetores, principalmente sob condições de hiposmolaridade.

Tabela 2.13: Valores médios de teste hiposmótico do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes formas de adição da dimetilformamida

Adição	HO
Única	21,46 a
Fracionada	28,08 b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey. HO = porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico.

Os resultados apresentados na tabela 2.13 nos mostram que para o teste hiposmótico ocorreu uma superioridade ($\alpha < 0,05$) da adição gradativa da dimetilformamida em relação à adição em uma única etapa da mesma. A adição gradativa do crioprotetor levaria a um menor choque e alteração osmótica, dando tempo à membrana plasmática da célula espermática se adaptar as modificações estruturais provocados pelo estresse osmótico. Diversos trabalhos (Neild et al., 2000; Ball e Vo, 2001; Pommer et al., 2002) têm relatado os fatores que determinam a tolerância osmótica da membrana plasmática dos espermatozóides e sua influência sobre a viabilidade espermática.

Na tabela 2.14 apresentamos o desdobramento de valores médios para substância dentro da osmolaridade inicial do meio diluidor base para o teste hiposmótico. Pela análise desta tabela, verificamos que, para a osmolaridade inicial de 300 mOsmol/L a gema integral foi superior a lipoproteínas e que na osmolaridade inicial de 400 mOsmol/L não ocorreu diferença estatística. Já quando avaliamos dentro de lipoproteínas, a osmolaridade de 400 mOsmol/L foi superior ($\alpha < 0,05$) a osmolaridade de 300 mOsmol/L.

Tabela 2.14: Valores médios de teste hiposmótico do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento quando realizado o desdobramento dos valores para substâncias dentro de Osmolaridade (mOsmol/L)

Osmolaridade	Substância	
	HO - LBD	HO - Gema
300 (mOsmol/L)	15,17a A	26,67b A
400 (mOsmol/L)	27,42a B	29,83a A

Médias seguidas de diferente letra minúscula diferem entre si nas linhas, médias seguidas de diferente letra maiúscula diferem entre si nas colunas ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey.

Em síntese, podemos verificar que para o teste hiposmótico todas as três variáveis avaliadas nesse experimento foram estatisticamente significativas, onde a gema de ovo pura foi superior a lipoproteína; a osmolaridade inicial de 400 mOsmol/L do meio diluidor base foi superior a osmolaridade inicial de 300 mOsmol/L e a adição da dimetilformamida de forma fracionada foi superior a adição em uma única etapa.

Os resultados obtidos para a análise de variância referente às avaliações da integridade estrutural da membrana plasmática dos espermatozóides, avaliados pelo teste de fluorescência estão apresentados na tabela 2.4A (em anexo). As análises desses resultados nos mostram que existem diferenças significativas para o número de espermatozóides íntegros em relação à osmolaridade do meio inicial e formas de adição da dimetilformamida, e para lesados em relação à substância utilizada e osmolaridade do meio base.

Os resultados médios referentes ao teste de fluorescência pós-descongelamento, em relação à substância utilizada como base do meio diluidor, osmolaridade inicial do meio base e formas de adição da dimetilformamida, do sêmen de seis garanhões estão representadas nas tabelas 2.15, 2.16 e 2.17 respectivamente.

Tabela 2.15: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes substâncias

Tratamento	SPTZ Íntegros	SPTZ Semilesados	SPTZLesados
LBD	43,71 a	12,38 a	44,33 a
Gema	48,00 a	15,63 a	36,38 b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey. SPTZ = espermatozóides.

Tabela 2.16: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes Osmolaridades (mOsmol/L)

Osmolaridade	SPTZ Íntegros	SPTZ Semilesados	SPTZLesados
300 (mOsmol/L)	41,99 a	13,46 a	43,50 a
400 (mOsmol/L)	49,75 b	14,54 a	37,21 b

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey. SPTZ = espermatozóides.

Tabela 2.17: Valores médios de teste de fluorescência do sêmen de seis garanhões, obtidos pós-descongelamento para duas diferentes formas de adição da dimetilformamida

Adição	SPTZ Íntegros	SPTZ Semilesados	SPTZLesados
Única	44,50 a	13,42 a	39,38 a
Fracionada	48,21 b	14,58 a	32,33 a

Médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si ($\alpha < 0,05$), Teste realizado: Tukey. SPTZ = espermatozóides.

Podemos observar nessas tabelas que, para o número de espermatozóides lesados a gema de ovo integral foi estatisticamente superior as lipoproteínas, apresentando um menor número de estruturas lesadas. Resultado similares para a gema de ovo, foram encontrados por Alvarenga et al. (2004).

A osmolaridade inicial de 400 mOsmol/L do meio diluidor foi superior ($\alpha < 0,05$) a 300 mOsmol/L tanto para o número de espermatozóides íntegros como para os lesados. Ball e Vo, (2001) relataram que a integridade da membrana plasmática não foi alterada sob condições de hiperosmolaridade. Os resultados obtidos nesse experimento são similares aos reportados por Papa et al. (2004), quando o aumento da osmolaridade do meio diluidor inicial proporcionou aumento da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides, avaliados pelo mesmo teste de fluorescência.

Para a adição fracionada da dimetilformamida neste experimento, ocorreu diferença estatística para o número de espermatozóides íntegros encontrados, sendo estes resultados semelhantes aos valores encontrados na literatura (Papa et al., 2004; Osório, 2006; Juliani et al. 2007).

3.5 CONCLUSÕES

Dos parâmetros avaliados neste experimento, somente para a motilidade não se observou efeito benéfico da adição fracionada e aumento de osmolaridade inicial do meio base sobre a viabilidade dos espermatozóides eqüinos criopreservados.

As lipoproteínas de baixa densidade na concentração de 20% usada em substituição a gema total não trouxe prejuízo na viabilidade dos espermatozóides pós descongelamento, logo pode ser usada em substituição a gema de ovo total.

O fracionamento e aumento da osmolaridade são procedimentos que poderiam ser incorporados os protocolos de congelamento para melhoria da viabilidade espermática, particularmente quando utilizada as lipoproteínas de baixa densidade.

ANEXOS

Tabela 2.1A: Análise de variância para motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático

FV	GL	Motilidade		Motilidade Progressiva		Vigor	
		Total		QM	F	QM	F
		QM	F				
Garanhão	5	863,0833		664,2703		0,3875	
Substância	1	1302,0833	11,79**	1764,1875	13,10**	1,0208	4,53*
mOsmol	1	102,0833	0,93 ^{n.s.}	256,6875	1,91 ^{n.s.}	0,5208	2,31 ^{n.s.}
Etapas	1	75,0000	0,68 ^{n.s.}	31,6875	0,24 ^{n.s.}	0,0208	0,09 ^{n.s.}
Substância X mOsmol	1	533,3333	4,83*	744,1875	5,53*	0,0208	0,09 ^{n.s.}
Subst X Etapas	1	468,7500	4,25*	526,6875	3,91 ^{n.s.}	0,5208	2,31 ^{n.s.}
mOsmol X Etapas	1	52,0833	0,47 ^{n.s.}	72,5208	0,54 ^{n.s.}	0,1875	0,83 ^{n.s.}
Subst X mOsmol X Etapas	1	208,3333	1,89	204,1875	1,52 ^{n.s.}	0,1875	0,83 ^{n.s.}
Erro	35	110,4167		134,6994		0,2256	
Coefic de Variação		23,79%		30,43%		14,34%	
Média		44,1667		38,1458		3,3125	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela 2.2A: Análise de variância para morfologia espermática

FV	GL	Morfologia	
		QM	F
Garanhão	5	647,1208	
Substância	1	38,5208	2,54 ^{n.s.}
mOsmol	1	4,6875	0,31 ^{n.s.}
Etapas	1	42,1875	2,78 ^{n.s.}
Substância X mOsmol	1	11,0208	0,73 ^{n.s.}
Substância X Etapas	1	7,5208	0,50 ^{n.s.}
mOsmol X Etapas	1	0,5208	0,03 ^{n.s.}
Substância X mOsmol X Etapas	1	50,0208	3,30 ^{n.s.}
Erro	35	15,1685	
Coefic de Variação		6,35%	
Média		61,3542	

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela 2.3A: Análise de variância para teste hiposmótico (HO)

FV	GL	HO	
		QM	F
Garanhão	5	402,9708	
Substância	1	581,0208	19,76**
Osmolaridade	1	713,0208	24,25**
Adição	1	526,6875	17,92**

Substância X Osmol	1	247,5208	8,42**
Substância X Adição	1	0,5208	0,02 ^{n.s.}
mOsmol X Adição	1	9,1875	0,31 ^{n.s.}
Substância X mOsmol X Adição	1	4,6875	0,16 ^{n.s.}
Erro	35	29,3994	
Coeficiente de Variação			21,89%
Média			24,7708

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela 2.4A: Análise de variância para íntegros, semilesados e lesados

FV	GL	Íntegros		Semilesados		Lesados	
		QM	F	QM	F	QM	F
Garanhão	5	1307,0708		562,9500		1290,4708	
Substância	1	221,0208	3,22 ^{n.s.}	126,7500	5,06*	760,0208	11,91**
mOsmol	1	728,5208	10,62**	14,0833	0,56 ^{n.s.}	475,0208	7,44**
Etapas	1	88,0208	1,28 ^{n.s.}	16,3333	0,65 ^{n.s.}	46,0208	0,72 ^{n.s.}
Substância X mOsmol	1	15,1875	0,22 ^{n.s.}	1,3333	0,05 ^{n.s.}	1,6875	0,03 ^{n.s.}
Subst X Etapas	1	72,5208	1,06 ^{n.s.}	0,0833	0,00 ^{n.s.}	46,0208	0,72 ^{n.s.}
mOsmol X Etapas	1	204,1875	2,98 ^{n.s.}	30,0833	1,20 ^{n.s.}	105,0208	1,65 ^{n.s.}
Subst X mOsmol X Etapas	1	35,0208	0,51 ^{n.s.}	33,3333	1,33 ^{n.s.}	105,0208	1,65 ^{n.s.}
Erro	35	68,6327		25,0643		63,8232	
Coefic de Variação		18,07%		35,76%			
Média		45,8542		14,0000			

** significativo pelo teste F ao nível de 1 %, * significativo pelo teste F ao nível de 5%, n.s. não significativo pelo teste F.

Tabela 2.5A - Osmolaridade e pH final dos meios diluidores de sêmen de seis garanhões

Diluidores	Osmolaridade (mOsmol/L)	pH
Tratamento 1	1024	6,57
Tratamento 2	1065	6,48
Tratamento 3	1023	6,58
Tratamento 4	1051	6,53
Tratamento 5	1024	6,29
Tratamento 6	1065	6,46
Tratamento 7	1023	6,42
Tratamento 8	1051	6,40

Tratamento 1: meio INRA 82, com 20% de LBD e 5% de dimetilformamida - 300mOsmol/L; **Tratamento 2:** meio INRA 82, com 20% de LBD e 5% de dimetilformamida - 400 mOsmol/L; **Tratamento 3:** meio INRA 82, com 2% de gema ovo e 5% de dimetilformamida - 300 mOsmol/L; **Tratamento 4:** meio INRA 82, com 2% de gema ovo e 5% de dimetilformamida - 400 mOsmol/L; **Tratamento 5:** meio INRA 82, com 20% de LBD e 5% de dimetilformamida - 300 mOsmol/L; **Tratamento 6:** meio INRA 82, com 20% de LBD e 5% de dimetilformamida - 400 mOsmol/L; **Tratamento 7:** meio INRA 82, com 2% de gema ovo e 5% de dimetilformamida - 300 mOsmol/L; **Tratamento 8:** meio INRA 82, com 2% de gema ovo e 5% de dimetilformamida - 400 mOsmol/L.

4. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Considerando a procura de pesquisadores em produzir um meio extensor de composição padronizada e objetivando a determinação de um protocolo de congelamento ideal para a espécie eqüina, a confirmação nos eqüinos, de que as lipoproteínas de baixa densidade obtida da gema do ovo representam uma opção viável na criopreservação espermática, pode ser considerada como uma contribuição favorável para a melhoria na qualidade espermática pós descongelamento.

A utilização destas lipoproteínas de baixa densidade mostrou-se uma opção viável, e ainda, ajustes na osmolaridade do meio base e nas formas de adição fracionada do crioprotetor podem incrementar a qualidade espermática pós-descongelamento.

Considerando que o uso de leite ou gema em meios extensores podem vir a causar impedimentos para importação e exportação de sêmen, devidos à barreira sanitária, os resultados obtidos contribuíram para formulação de meio de composição padronizada e com menos riscos sanitários. A maior dificuldade na aplicação imediata destas alternativas considerando o trabalho adicional na formulação dos meios extensores pode ser compensada se pudermos, com estudos adicionais, melhorarmos ainda mais a viabilidade espermática pós-descongelamento, mantendo o princípio de produzir meios extensores totalmente padronizáveis.

Novos estudos deverão ser conduzidos para maior esclarecimento dos efeitos das lipoproteínas de baixa densidade; e da influência destas lipoproteínas sobre as diferentes etapas do processo de criopreservação e sobre a viabilidade dos espermatozóides eqüinos criopreservados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGCA, Y.; GILMORE, J.; BYERS, M.; WOODS, E.J.; LIU, J.; CRITSER, K. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders. *Biology of Reproduction*.v.67, p.1493-1501, 2002.
- ALVARENGA, M. A.; GRAHAM, J.K.; KEITH, S.L.; LANIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, E.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. *14th International Congress of Animal Reproduction*. v.2, p. 157, 2000. (abstract).
- ALVARENGA, M.A.; LEÃO, K.M.; PAPA, F.O.; GRAHAM, J.M. Improvement of stallion sêmen post-thaw motility with the utilization of dimethyl-formamide as cryoprotector. *Theriogenology*. v.57, n.1, p.459, 2002.
- ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O.; LEÃO, K.M.; MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M. Improvement of post-thaw stallion spermatozoa quality with the utilization of dimethyl formamide as a cryoprotector. *15th International Congress of Animal Reproduction*. v.2, p. 500, 2004. (abstract).
- 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.
- ALVES, S.G.G.; FILHO, A.;L.R.; SNOECK, P.P.N.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, R.F.; PORTELA, A.P.M.; ALMEIDA, A.K.; MELO, M.I.V.; HENRY, M. Efeito da solução, da fixação em formol-salina e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para sêmen eqüino congelado. *Ciência Animal Brasileira*. v. 6, n.3, p.219-224, 2005.
- AMANN, R.P; PICKETT, B.W. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal Equine Veterinarian Science*. v.7, p. 145-173, 1987.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GÉRARD, O.; COURTENS, GL.; ANTON, M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LBD: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, v.61, p.895-907, 2004.
- ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). UNESP, Tese para obtenção do título de livre docente, UNESP-Botucatu, 118p, 2000.
- ARRUDA, R.P., BALL, B.A., GRAVANCE, C.G., GARCIA, A.R., LIU, I.K.M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morfometry. *Theriogenology*, v.58, p.253-256, 2002.
- AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE,H. AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, v.46, n.5, p.791-797, 1996.

- BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. v21, n.2, p.47-51, 1957.
- BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potencial. *Journal of Andrology*. v. 22, n.6, p. 1061-1069, 2001.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. 284p. Ames, Iowa, 1989.
- BAUMBER, J., BALL, B.A., LINFOR, J.J., MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*. V.24, p.621-628, 2003.
- BEDFORD, S.J.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K., AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.43, p.955-967, 1994.
- BERGERON, A.; CRETE, M.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins from bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction*. v.70, p.708-717, 2004.
- BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science*. v.65, p.75-88, 2001.
- CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; RIGAU, T.; BONET, S.; et al. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. *Theriogenology*, v.47, p.765-784, 1997.
- CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; MEDEIROS, A.S.L.; ARAUJO, G.H.M.; ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion semen post-thaw motility with the association dimethyl formamide and methyl formamide as cryoprotectors. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.286-288, 2005.
- COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Fertility of frozen-thawed stallion semen extended in lactose-edta-egg yolk extender and packaged in 1.0-ml straws. *Theriogenology*, v.20, p.735-742, 1983.
- COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P.; PICKETT, B.W. Effects of centrifugation, glicerol level, cooling to 5° C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, v.22, n.1, p.25-39, 1984.
- COLENBRANDER, B., GAELLA, B. M., STOUT, T. A. E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reproduction of Domestic Animals*. v.38, p.305-311, 2003.

COTTORELLO, A.C.P.; HENRY, M.; FERREIRA, M.K.V.; JULIANI, G.C. Efeito da associação do etilenoglicol ao glicerol na criopreservação do sêmen eqüino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.25, n.3, p.456-457, 2001.

COTTORELLO, A.C.P. Criopreservação de sêmen eqüino utilizando associação do etilenoglicol e glicerol. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 47p, 2002.

CRABO, B.G. Physiological Aspects of Stallion Semen Cryopreservation. In *Reproduction – The use of frozen semen. Proceedings of American Association Equine Practice*. V.47, p.291-295, 2001.

CRISTANELLI, M.J.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effects of egg yolk and glycerol level in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 234, p.25–38, 1985.

DEMIANOWICZ, W.; STRZEZEK, J. The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reproduction Domestic Animals*. v.31, p.279-280, 1996.

DEMICK, D.S.; VOSS, J.L.; PICKETT, B.W. Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. *Journal Animal Science*, v.43, p.633-637, 1976.

DELLÁQUA, J.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A.; LEONARDO, H. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado eqüino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.26, n. 3, 2002.

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. *Ann. Méd. Vét.* v.4, p.215-224, 1976.

DREVIUS, L.O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* v. 42, p.136-156, 1966.

ECOT, P.; VIDAMENT, M.; de MORNAC, A.; PERIGAUT, K.; CLEMENT, F.; PALMER, E. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *J. Reprod. Fert.*, v.56, (suppl.), p.141-150, 2000.

EVANS, R.C.; BANDEMER, S.L.; DAVIDSON, J.A. Binding of lipid to protein in low density lipoprotein from egg yolk. *Biochim. Biophys. Acta*, v.164, p.566-574, 1968.

EVANS, R.C.; BAUER, D.H.; BANDEMER, S.L.; VAGHEL, S.B.; FLEGAL, C.J. Structure of egg yolk very low density lipoprotein. Polydispersity of the very low density lipoprotein and the role of lipovitellenin in the structure. *Arch. Biochem. Biophys.* v.154, p.493-500, 1973.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on freezing of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, v.49, p.277-284, 1977.

FURST, R.; CARVALHO, G.R.; FURST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.57, n.5, p.599-607, 2005.

GARNER, D.L., PINKEL, D., JOHNSON, L.A. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, v.34, p.127-138, 1986.

GAO, G.Y., ASHWORTH, E., WATSON, P.F., KLEINHANS, F.W., MAZUR, P.; CRITSER, J.K. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biology of Reproduction*, v.49, pg.112-123, 1993.

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

GILMORE, J.A.; JUNYING, Du.; TAO, Jun.; PETER, A.T.; CRITSER, J.K. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Journal of reproduction and fertility*. v.107, p.87-95, 1996.

GILMORE, J.A.; LIU, J.; GAO, G.Y.; CRITSER, J.K. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Human Reproduction*. v.12, p.112-118, 1997.

GILMORE, J.A.; LIU, J.; PETER, A.T.; CRITSER, J.K. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*. v.58, p.28-36. 1998.

GIRAUD, M.N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction*. v.15, p.2160-2164, 2000.

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

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Reprod. Techn.*, v.12, n.1, p.131-147, 1996.

GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. (abstract), p.307, 2000.

GRIGGERS, S.; PACCAMONTI, R.A.; THOMPSON, B.E.; EILTS, B.E. THE EFFECTS OF pH, OSMOLARITY AND URINE CONTAMINATION ON EQUINE SPERMATOZOAL MOTILITY. *Theriogenology*. v. 56, pa. 613-622, 2001.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, v.29, p.26-38, 1992.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.88, p.343-352, 1990.

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K.; PICHETT, B.W.; HAMILTON, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet. J.*, v.28, n.1, p.47-53, 1996.

HENRY, M., SNOECK, P.P.N., COTTORELLO, A.C.P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology*. v.58, p.245-248, 2002.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars. Vet.*, v.10, n.2, p.156-165, 1994.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M; Et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal Reproductive Fertility*. v.70, p.219-228, 1984.

JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN, H.H., ZANEVELD, L.J.D. The hypoosmotic swelling test: na update. *Arch. Androl.*, v.29, p.105-116, 1992.

JEYENDRAN, R.S., ZANEVELD, L.J.D. Controversies in the development and validation of new sperm assays. *Fertility and Sterility*, v.59, pg.726-728, 1993.

JULIANI, G.C.; HENRY, M.; MIRON, D.M.; MELO, M.I.V.; BISPO, C. Congelamento de sêmen eqüino: efeito de diferentes crioprotetores e meios diluidores. *Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, 2002.

JULIANI, G.C. Congelamento do sêmen eqüino em diferentes diluidores. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 50p, 2003.

JULIANI, G.C.; SNOECK, P.P.N.; HENRY, M. Efeito da trealose ou rafinose associada a acetamida/metilcelulose na criopreservação de sêmen eqüino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, n.3, p.355-356, 2003.

JULIANI, G.C.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Freezing of equine semen in extenders with low density lypoproteins. *15th International Congress of Animal Reproduction*. ICAR. v.2, p. 498, 2004. (abstract).

JULIANI, G.C.; HENRY, M. Effects of low density lypoproteins and dimethyl formamide in differents freezing rates on equine frozen semen. *Symposium on Animal Biology of Reproduction*, v.3, n.2, p. 270. 2006.

JULIANI, G.C; OSÓRIO, J.P.; LAGARES, M.A.; ALVES, B.R.C.; HENRY, M. Efeito da adição fracionada da dimetil formamida na criopreservação espermática eqüina. *Anais do XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, p.176, 2007. Disponível em www.cbra.org.br/publicacoes.do.

- KAMPSCHMIDT, R.F.; MAYER, D.T.; HERMAN, H.A. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, v.36, p.733-743, 1953.
- LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Preservação do semen equino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. *Arquivo Faculdade Veterinária UFRGS*, v.26, p.29-42, 1998.
- LAGARES, M.A.; MEIRELLES, L.S.; WALD, V.B. Manutenção da membrana plasmática do espermatozóide equino no sêmen resfriado com diferentes diluentes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. v.23, n.3, p.295-297, 1999.
- LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUG, E. Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrologia*, v.32, p.163-167, 2000.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C; MEDEIROS, A.F; PAPA, F.O; ALVARENGA, M.A. Evaluation of acrosomal integrity of stallions cryopreserved with amides and glycerol. *Animal Reproduction Science*, v.89, p. 288-291, 2005.
- LIU, Z.; FOOTE, R.H. Osmotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and nonpermeable agents. *Cryobiology*. v.37, p. 207-218, 1998.
- LOOMIS, P.R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. *Procedures of American Association of Equine Practice*, v.38, p.629-647,1992.
- MADRID-BURY, N., PEREZ, G. J. F., MOREIRA, P., SANJUANBENITO, B.P., GUTIERREZ, A. A., DE LA FUENTE, M. J. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. *Theriogenology*, v.64, p.232-241, 2005.
- MANJUNATH, P., THERIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification the occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*. v.53, p.109-119, 2002.
- MANJUNATH, P., NAUC, V., BERGERON, A., MENARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology Reproduction*. v.4, n.67, p.1250-1258, 2002.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.27, (suppl.), p.47-51, 1979.
- MARTIN, C.E.G. Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozoides equinos criopreservados. Dissertação, Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 17p, 2005.
- MAYER, D.T.; LASLEY, J.F. The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities, and fertilizing capacity of mammalian spermatozoa. *Journal Animal Science*, v.4, p.261-269, 1945.

MCBEE, L.; COTTERILL, O. Ion exchange chromatography and electrophoresis of egg. *J. Food Sci.*, v.44, p.656-660, 1979.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootenia.*, v.51, n.1, p.71-78, 1999.

MELO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para a avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootenia.*, v.57, n.6, p.757-763, 2005.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology.* v.58, p.273-276, 2002.

MEDEIROS, A.S.L. Criopreservação de sêmen de garanhão utilizando diferentes amidas. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo – UNESP, Botucatu, 123 p, 2003.

MEDEIROS, A.S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Avaliação da integridade acrossomal de espermatozoides de garanhões criopreservados com crioprotetores a base de amidas e glicerol. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* v.27, n.3, 2003.

MERCANTE, C.F.J., ARRUDA, R.P., NEVES NETO, J.R. et al. Congelação de sêmen eqüino em etilenoglicol ou glicerol: motilidade, vigor e teste de termorresistência. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1995. *Anais...* Belo Horizonte, MG: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, p.290, 1995.

MERKT, H.; KLUG, E.; KRAUSE, D. et al. Results of long-term storage of stallion semen frozen by the pellet method. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 23, p. 105-106, 1975.

MEYERS, S.A. Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal Reproduction Science.* v. 89, p.57-64, 2005.

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

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

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

MORRIS, L.H.A.; HUNTER, R.H.F.; ALLEN, W.R. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. *J. Reprod. Fertil.*, v.118, p.95-100, 2000.

- NIE, G.J.; WENZEL, J.G.W. Adaptation of the hypoosmotic test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, v.55, p.1005-1018, 2001.
- NIE, G.J.; WENZEL, J.G.W.; JOHNSON, K.E. Comparison of pregnancy outcome in mares among methods used to evaluate and select spermatozoa for insemination. *Animal Reproduction Science*, v.69, p.211-222, 2002.
- NEILD, D.M., CHAVES, M.G., FLORES, M. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.51, p.721-727, 1999.
- NEILD, D.M., CHAVES, M.G., FLORES, M., MIRAGAYA, M.H., GONZALEZ, E., AGÜERO, A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*. v.32, p.351-355, 2000.
- NEILD, D.M.; GADELLA, D.M.; CHAVES, M.G.; MIRAGAYA, M.H.; COLENBRANDER, B. AGÜERO, A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*. v. 59, p.1693-1705, 2003.
- NEILD, D.M.; GADELLA, B.M.; AGÜERO, A.; SOTUT, T.A.E.; COLENBRANDER, B. Capacitation, Acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. v. 89, p.47-56, 2005.
- NEVES, J.P; HENRY, M. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: *Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, 2º edição, 49p, 1998.
- NEVES NETO, J.R., MERCANTE, C.F.J., ARRUDA, R.P. et al. Fertilidade do sêmen equino congelado com etilenoglicol ou glicerol. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL*, 11, 1995, Belo Horizonte, MG: *Anais...* Belo Horizonte, MG: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, p.292, 1995.
- OLIVEIRA, E.C.S.; JULIANI, G.C.; HENRY, M. Comparação entre os diluidores INRA 82 e Tris associados aos crioprotetores glicerol e dimetilformamida na preservação de sêmen canino utilizando técnica de congelamento computadorizada. *Anais do XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, Goiânia, p.1, 2005.
- OLIVEIRA, E.C.S.; JULIANI, G.C.; MARQUES, A.P.; HENRY, M. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.58, n.6, p.1116-1122, 2006.
- OSORIO, J.P. Efeito da adição fracionada de crioprotetor e das curvas de congelamento na viabilidade espermática pós-descongelamento em equinos. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 37p, 2006.
- OSORIO, J; HENRY, M.; JULIANI, G.C. Effects of fractioned addition of dimethyl formamide in the viability of cryopreserved stallion semen in different procedures of freezing. *Symposium on Animal Biology of Reproduction*, v.3, n.2, p. 269. 2006.

PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal Animal Science*, v.39, p.1144-1149, 1974.

PACE, M.; SULLIVAN, J.J. Effect of timing insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 23. Supplement, p.115–121, 1975.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: *Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction Artificial Insemination*. v.3, p.377-378, 1984. Abstract.

PAPA, F.O.; MACEDO, L.P.; MELO, C.M.; GOMES, G.M.; DELL'AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A. Relationship between the increase in MP50 extender osmolarity and the improvement of freezability of bad freezer stallions. *15th International Congress of Animal Reproduction*. v.2, p. 505, 2004. (abstract).

PARKS, J.E., GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.

PICKETT, B.W. Seminal extenders and cooled semen. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.), *Equine reproduction*, Malvern: Lea & Fabiger, 1993. p.746-754.

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

POLGE, C. Freezing of spermatozoa. In: *Ashwood-Smith, M.J., Farrant, J., editors. Low temperature preservation in medicine and biology*. Tunbridge Wells, Kent: Pitman Medical, p.45-64, 1980.

POMMER, A.C.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S.A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*. v.58, p. 1373-1384, 2002.

QUINN, P. J.; CHOW, P.Y.W.; WHITE, I.G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil*, v.60, p.403-407, 1980.

SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C., CRABO, B.G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *Journal Reproduction Fertility*. (Suppl.) v.44, p.107-144, 1991.

SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; JULIANI, G.C. Efeito de três temperaturas de descongelamento sobre os espermatozoides eqüinos congelados com diferentes agentes crioprotetores. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.26, n.3, p.181-184, 2002.

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

- SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1056-1065, 2004.
- SQUIRES, E.L. Integration of future biotechnologies into the equine industry. *Animal Reproduction Science*. v.89, p.187-198, 2005.
- TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal Reprod. Fertil*, (suppl.),v.27,p.53-59, 1979.
- VASQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; MARTINEZ, P.; et al. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, v. 47, p.913-922, 1997.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, v.48, p.907-917, 1997.
- VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P. Centrifugation and additions of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. v.54, p.907-919, 2000.
- VIDAMENT, M.; YVON, J.M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTRON, S.; Le TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.201-218, 2001.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethylformamide. *Theriogenology*. v.58, p.249-251, 2002.
- VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.115-136, 2005.
- WATSON, P.F. Effects of low temperature on biological membranes. *Morris and Clarke Edition. London Academic Press*.1981.
- WATSON, P.F.; KUNZE, E.; CRAMER, P.; HAMMERSTEDT. R.H. A comparison of critical osmolality and hydraulic conductivity and its activation energy in fowl and bull spermatozoa. *Journal of Andrology*. v.13, p.131-138. 1992.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproductive Fertility Development*. v.7, p.871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*., v.60, n.61, p.481-492, 2000.

WESSEL, J.S., BALL, B.A. Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.84, p.147-156, 2004.

WILLOUGHBY, C.E; MAZUR, P.; PETER, A.T.; CRITSER, J.K. Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. *Biology of Reproduction*. v.55, p.715-727, 1996.

ZUCCARI, C.E.S.N. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina. 121p. *Tese* (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.