

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ADIÇÃO FRACIONADA
DA DIMETILFORMAMIDA NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

Fernanda Guimarães Cardoso de Mello

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2005

Fernanda Guimarães Cardoso de Mello

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ADIÇÃO FRACIONADA
DA DIMETILFORMAMIDA NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre
em Medicina Veterinária.

Área de Concentração: Reprodução Animal
Orientador: Marc Roger Jean Marie Henry

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2005**

M527a Mello, Fernanda Guimarães Cardoso de, 1975-

Avaliação *in vitro* da adição fracionada da dimetilformamida na criopreservação de sêmen eqüino / Fernanda Guimarães Cardoso de Mello. – 2005.
50 p. : il.

Orientador: Marc Roger Jean Marie Henry

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Eqüino – Reprodução – Teses. 2. Sêmen – Análise – Teses. 3. Criopreservação – Teses.

I. Henry, Marc Roger Jean Marie. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 926

Dissertação defendida e aprovada em 30 de Maio de 2005, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:



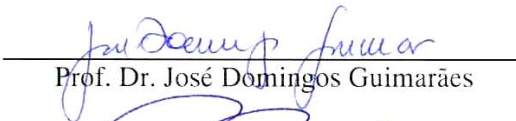
Prof. Dr. Marc Roger Jean Marie Henry
Orientador



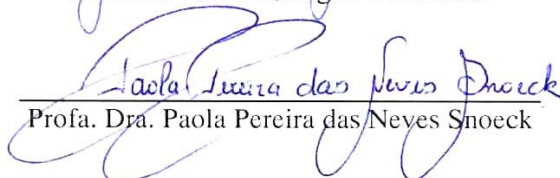
Prof. Dr. Alan Maia Borges



Prof. Dr. Elmo Gomes Diniz



Prof. Dr. José Domingos Guimarães



Profa. Dra. Paola Pereira das Neves Snoeck

Dedico aos meus pais, Luiz e Denise, à minha irmã Juliana e ao meu noivo Juliano por me ensinarem o que realmente importa na vida: amor, caráter e conhecimento.

“O mais importante não é onde estamos, mas em que rumo nos dirigimos. Para chegar ao porto do paraíso, devemos, às vezes, navegar a favor do vento, e outras, contra; mas deve-se navegar, e não ir à deriva nem jogar as âncoras”.

Oliver W. Holmes Jr.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por acreditarem nos meus sonhos e me apoiarem incondicionalmente.

Ao Professor Marc Henry, pela orientação, ensinamentos, pela imensa contribuição em minha formação acadêmica e profissional e, principalmente, pela confiança em mim depositada.

Aos professores da banca examinadora Alan Maia Borges, Elmo Gomes Diniz, José Domingos Guimarães e Paola Pereira das Neves Snoeck, pela valiosa contribuição com esta dissertação.

Ao Juliano, meu noivo e grande amor da minha vida, por me fazer acreditar no que realmente vale a pena.

Ao Professor João Biondini, por me ensinar que “*a simplicidade é o que existe de mais difícil no mundo, é o limite extremo da experiência e o último fruto de um gênio*” e a seu filho, o Médico-Veterinário Eros Ferreira Biondini, pelo apoio profissional, amizade e respeito, pelo muito que me ensinou e pelo sucesso obtido com a utilização das amostras de sêmen congeladas, em um dos protocolos do presente trabalho, no programa de transferência de embriões por nós realizado.

Ao Sr. Wander Mello, proprietário do Haras Visão, por permitir a realização deste experimento em sua propriedade, nos recebendo com extremo carinho e profissionalismo. Aos funcionários do haras, pela valiosa ajuda e excelente convívio durante a realização desse trabalho.

À toda equipe do Professor Marc Henry, em especial ao Márcio, ao Jair e à Alessandra pelo imenso auxílio na condução deste experimento. Ao Geraldo, pela ajuda na viabilização do projeto piloto desse trabalho.

Ao Professor Alan Maia Borges, pela ajuda na mensuração das osmolaridades dos meios de centrifugação e de congelamento deste experimento. À Professora Ângela Lana, pela ajuda na realização da análise estatística desta dissertação. À Professora Rogéria Serakides, pela ajuda na realização das fotos do teste hiposmótico.

Aos meus familiares, por acreditarem no valor de um ideal.

A Deus, e à minha avó querida, *in memoriam*, por iluminarem meu caminho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Vantagens e desvantagens da criopreservação espermática do sêmen equino	14
2.2 Aspectos fundamentais da criopreservação	14
2.2.1 <i>Estrutura espermática</i>	15
2.2.2 <i>Mudanças que ocorrem durante o congelamento e o descongelamento</i>	16
2.3 Diluidores seminais	17
2.4 Métodos de avaliação espermática	20
2.5 Etapas do congelamento	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Garanhões e coleta do sêmen	26
3.2 Avaliação seminal e espermática	27
3.3 Processamento do sêmen para o congelamento	27
3.4 Tratamentos em teste	28
3.5 Métodos de avaliação espermática	29
3.5.1 <i>Motilidade e vigor</i>	29
3.5.2 <i>Morfologia espermática</i>	29
3.5.3 <i>Teste de termo-resistência</i>	29
3.5.4 <i>Avaliação da integridade funcional da membrana plasmática da cauda do espermatozóide por meio do teste hiposmótico (HO)</i>	29
3.5.5 <i>Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática por meio de sondas fluorescentes</i>	30
3.6 Análises estatísticas	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÕES	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
7. ANEXOS	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do diluidor básico utilizado no INRA 82 com 20mMoles Hepes e dos diluidores derivados D1 e D2	28
Tabela 2. Preparo da solução de sacarose a 100 mOsmol/kg (solução hiposmótica).	30
Tabela 3. Composição das soluções estoque e de trabalho empregadas na técnica de fluorescência para a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozóides	31
Tabela 4. Características físicas do sêmen, <i>in natura</i> , de nove garanhões da raça Mangalarga Marchador	32
Tabela 5. Parâmetros espermáticos, pré-congelamento, de nove garanhões, avaliados imediatamente após a adição do crioprotetor dimetilformamida ao meio base, em única ou múltiplas etapas	32
Tabela 6. Porcentagem de motilidades espermáticas total e progressiva pós-descongelamento de espermatozóides equinos congelados por várias técnicas	33
Tabela 7. Vigor espermático pós-descongelamento de espermatozóides equinos congelados por várias técnicas	34

Tabela 8. Porcentagem de células espermáticas com integridade funcional da membrana plasmática (HO) pós-descongelamento imediatamente após o descongelamento, 30 e 60 minutos de TTR, submetidas a diferentes protocolos de congelamento	34
Tabela 9. Porcentagem média de espermatozóides eqüinos com integridade das membranas plasmática e acrossomal submetidos a quatro técnicas de congelamento	38
Tabela 10. Correlações entre os parâmetros espermáticos avaliados imediatamente após o descongelamento	40
Tabela A.1. Médias, desvios e erros padrões pós-descongelamento de espermatozóides eqüinos congelados por várias técnicas e submetidos ao teste de termo-resistência	48
Tabela A.2. Análise de variância – comparação da motilidade total entre os tratamentos	49
Tabela A.3. Análise de variância – comparação da motilidade progressiva entre os tratamentos	49
Tabela A.4. Análise de variância – comparação da porcentagem de espermatozóides íntegros entre os tratamentos.	49
Tabela A.5. Análise de variância – comparação da porcentagem de espermatozóides lesados entre os tratamentos	50
Tabela A.6. Análise de variância – comparação da porcentagem de espermatozóides semi-lesados entre os tratamentos	50
Tabela A.7. Análise de variância – comparação de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (HO) entre os tratamentos nos três tempos testados	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. a = alteração morfológica da cauda do espermatozóide eqüino que pode caracterizar uma reação hiposmótica; b = espermatozóide sem reação ao teste hiposmótico. Material fixado em formol-salina e corados pela técnica do Rosa de bengala. Aumento de 1071x	30
Figura 2. Médias da motilidade espermática progressiva de espermatozóides de cinco garanhões congelados por quatro protocolos e submetidos ao teste de termo resistência pós-descongelamento. T1 – Adição do crioprotetor, em uma única etapa, sem resfriamento prévio, T2 – Adição do crioprotetor, em múltiplas etapas, sem resfriamento prévio, T3 – Adição do crioprotetor, em uma única etapa, com resfriamento prévio, T4 – Adição crioprotetor, em múltiplas etapas, com resfriamento prévio. Média de cinco garanhões.	35
Figura 3. Motilidade espermática total e progressiva e vigor do movimento espermático de eqüinos submetidos a quatro protocolos de congelamento. Média de nove garanhões e comportamento individual dos mesmos. T1- Adição do crioprotetor, em única etapa, sem resfriamento prévio; T2- Adição do crioprotetor, em múltiplas etapas, sem resfriamento prévio; T3- Adição do crioprotetor, em única etapa, com resfriamento prévio; T4- Adição do crioprotetor, em múltiplas etapas, com resfriamento prévio.	37
Figura 4. Motilidade progressiva, percentual de células com membranas estruturalmente íntegras e percentual de células com membrana plasmática funcionalmente íntegras no tempo 0 após o descongelamento de espermatozóides eqüinos submetidos a quatro protocolos de congelamento. Média de nove garanhões e comportamento individual dos mesmos. T1- Adição do crioprotetor em uma única etapa sem resfriamento prévio; T2- Adição do crioprotetor em múltiplas etapas sem resfriamento prévio; T3- Adição do crioprotetor em única etapa com resfriamento prévio; T4- Adição do crioprotetor em múltiplas etapas com resfriamento prévio.	39

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos avaliar a eficiência de duas formas de adição da dimetilformamida a 5%, utilizando-se como meio diluidor base o INRA 82 modificado, e de duas curvas de congelamento na preservação espermática eqüina, avaliada *in vitro*. Objetivou-se também verificar o grau de lesão dos espermatozóides durante as diversas etapas do processo de criopreservação. Um ejaculado de nove garanhões foi utilizado para testar quatro tratamentos: adição do crioprotetor, em única etapa, sem resfriamento prévio (T1- controle); adição do crioprotetor, em múltiplas etapas, sem resfriamento prévio (T2); adição do crioprotetor, em única etapa, com resfriamento prévio (T3); e adição do crioprotetor, em múltiplas etapas, com resfriamento prévio (T4). O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL e congelado três centímetros acima da lâmina do nitrogênio líquido e posteriormente submerso no mesmo. O descongelamento foi realizado a 52°C por dez segundos, seguido da imersão em banho-maria a 37°C por mais trinta segundos. Após a adição do crioprotetor, em única ou múltiplas etapas, foram avaliados os parâmetros espermáticos de motilidade espermática total, progressiva e vigor do movimento espermático, em microscopia óptica (aumento de 400X). A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico. Após o descongelamento, foram avaliados os parâmetros de motilidade espermática total, motilidade espermática progressiva, vigor do movimento espermático e integridade estrutural das membranas espermáticas por meio de sondas fluorescentes (carboxifluoresceína e iodeto de propídeo). Os espermatozóides foram submetidos ao teste de termo-resistência. Imediatamente após a adição do crioprotetor, em única ou múltiplas etapas, não foram observadas diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$). Após o descongelamento, foi observada superioridade da adição do crioprotetor, em múltiplas etapas, em todos os parâmetros avaliados, independentemente da curva de congelamento adotada, com ou sem resfriamento controlado prévio ($p < 0,05$). A curva de congelamento, com resfriamento controlado prévio na velocidade de $-0,25^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$, foi mais eficaz na preservação da viabilidade espermática pós-descongelamento, em todos os parâmetros avaliados, independentemente da forma de adição do crioprotetor, em única ou múltiplas etapas ($p < 0,05$). Os resultados obtidos permitem concluir que a adição do crioprotetor, em múltiplas etapas, associado a uma curva de resfriamento lenta, foi o protocolo mais eficaz na preservação da viabilidade espermática eqüina, avaliada *in vitro*, após o descongelamento e que as injúrias são ocasionadas pelo estresse osmótico e pelo método de resfriamento dos espermatozóides.

Palavras chave: dimetilformamida, criopreservação, sêmen eqüino.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the efficacy of the manner of the cryoprotectant addition, one or multiple steps, and the cooling rate, on equine semen cryopreservation. The lesion intensity of the spermatozoa, during the process of the cryopreservation, was also studied. One ejaculate of nine stallions was used to test the modified INRA 82 with 5% of dimethyl formamide with the following treatments: addition of the dimethyl formamide in one step and fast cooling rate (T1- control), addition of the dimethyl formamide in multiple steps and fast cooling rate (T2), addition of the dimethyl formamide in one step and slow cooling rate (T3), addition of the dimethyl formamide in multiple steps and slow cooling rate (T4). After centrifugation of ejaculates in INRA 82 extender, sperm pellets were diluted with final extenders to reach the concentration of 100×10^6 sperm cells per ml. Semen was frozen three centimeters above the nitrogen level, during ten minutes, in 0.5 ml straws. Thawing of samples was done at 52°C for ten seconds followed by immersion of the straw in a water bath at 37°C for thirty seconds. Immediately post dimethyl formamide addition, total and progressive motility and sperm vigor were evaluated under light microscope (400X). The functional sperm membrane integrity was evaluated by the hypoosmotic swelling test. No differences between treatments were observed, before the cooling of the straw. Immediately post thaw, total and progressive motility and sperm vigor were evaluated under light microscope (400X). Functional and structural sperm membrane integrity were evaluated by the hypoosmotic swelling test and fluorescent dyes, carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide, respectively. The spermatozoa was also evaluated in the temperature resistance test. The multiple steps addition of the cryoprotectants was better than the one step addition in all parameters valued, independently from the cooling rate. The slow cooling rate was better than the fast cooling rate in all parameters valued, independently from the manner of the dimethyl formamide addition. It may be concluded that the association of the multiple steps addition of the dimethyl formamide with the slow cooling rate is the best protocol to freeze the equine semen and that the lesions caused by osmotic and cold stress may occur during the cooling and freezing process.

Key words: dimethyl formamide, cryopreservation, equine semen.

1. INTRODUÇÃO

A utilização do sêmen eqüino congelado é atualmente uma realidade em diversos haras nacionais. Dentre os fatores que impulsionaram a utilização desta biotecnologia destacam-se o uso crescente de animais geneticamente superiores, o interesse dos criadores em criopreservar os espermatozóides de gananhões de alto interesse comercial, além de técnicas de inseminação avançadas, como a inseminação artificial na junção útero-tubária, que incrementam a eficiência do sêmen congelado eqüino.

Entretanto, os protocolos de congelamento atualmente disponíveis, não proporcionam taxas de prenhez satisfatórias. A menor capacidade dos espermatozóides eqüinos em resistirem ao processo de criopreservação, bem como as diferenças existentes na resistência dos espermatozóides entre gananhões e entre ejaculados do mesmo indivíduo, são importantes entraves para o avanço desta biotecnologia (Vidament et al., 1997). A composição e a distribuição dos fosfolipídeos e a natureza dos ácidos graxos diferem de membrana para membrana e, até mesmo, dentro de determinadas regiões da mesma membrana plasmática. Porções da membrana plasmática do espermatozóide, contendo uma proporção relativamente alta de colesterol: fosfolipídeos, especialmente os poliinsaturados, podem ser mais resistentes às mudanças de temperatura (Pickett e Amann, 1993). Barbacini et al. (1999) atribuíram os poucos avanços no congelamento do sêmen eqüino, desde o relato da primeira prenhez obtida com a utilização desta biotecnologia em 1957 (Barker e Gandier, 1957), à ausência de seleção dos gananhões quanto à congelabilidade de suas células espermáticas, sendo a seleção feita exclusivamente quanto ao desempenho atlético dos animais. Apesar dos esforços em melhorar as técnicas de congelamento do sêmen eqüino, a perda da viabilidade

espermática pós-descongelamento ainda é um fator limitante para o uso disseminado dessa técnica, sendo a perda da integridade da membrana um tipo de injúria frequentemente observada nas células espermáticas após o descongelamento, o que diminui a sobrevivência e a capacidade fecundante dos espermatozóides (Henry et al., 2002).

O sucesso obtido na criopreservação dos espermatozóides bovinos não tem sido obtido em outras espécies de mamíferos. Essas diferenças entre as espécies são, em parte, devido à fisiologia e à bioquímica dos próprios espermatozóides e às variações na anatomia e fisiologia do transporte espermático no trato reprodutivo feminino. Mesmo o melhor protocolo de criopreservação causa injúrias aos espermatozóides, diminuindo a eficiência em atingirem o sítio da fecundação, pois acessar este sítio, dentro da tuba uterina, envolve a superação de uma série de obstáculos que podem ter sido desenvolvidos exatamente para impedirem uma baixa qualidade espermática (Holt, 2000a). Segundo Parks e Graham (1992), a redução da fertilidade, quando da utilização do sêmen congelado, deve-se às alterações das estruturas e funções das membranas durante o resfriamento, congelamento e descongelamento. Evidências sugerem que as membranas são comprometidas durante o resfriamento e o reaquecimento devido à reorganização dos lipídeos das mesmas, prejudicando as associações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína, que são importantes para sua funcionalidade.

Os crioprotetores são essenciais para a sobrevivência das células durante o processo de criopreservação, porém, o crioprotetor mais comumente utilizado, o glicerol, pode afetar negativamente as células (Demick, 1976). O efeito tóxico do glicerol, associado à sua inabilidade em proteger mais da metade da população dos espermatozóides, estimula a pesquisa sobre crioprotetores

alternativos de menor toxicidade à célula espermática (Watson, 1995).

Hammersted e Graham (1992), ao estudarem a criopreservação espermática das aves, revisaram as ações do glicerol nos espermatozoides. Esses pesquisadores sugeriram que o glicerol afete a viscosidade citoplasmática, tão logo atinja o interior da célula, mudando as taxas de todos os processos de difusão. A viscosidade citoplasmática difere entre as espécies (Hammersted et al., 1978), sugerindo que o glicerol pode ter efeitos espécie-específicos nos espermatozoides (Holt, 2000b).

Na tentativa de se desenvolver protocolos de congelamento que melhor preservem as características espermáticas do sêmen equino após o descongelamento, Cotorello et al. (2001) testaram o efeito do etilenoglicol, isolado ou associado ao glicerol, na criopreservação do sêmen equino e não observaram diferença entre os tratamentos, concluindo que o etilenoglicol é uma alternativa viável na criopreservação do sêmen equino, avaliado *in vitro*, após o descongelamento. Snoeck et al. (2001), ao avaliarem diversos crioprotetores da célula espermática equina, demonstraram que a associação da acetamida com a metilcelulose e trealose pode ser utilizada como alternativa na criopreservação do sêmen equino. Juliani et al. (2003), comparando o efeito da trealose ou rafinose associadas a diferentes concentrações de acetamida no congelamento do sêmen equino, concluíram que a associação acetamida 5% com trealose foi a mais eficaz em preservar a viabilidade espermática, avaliada *in vitro*, pós-descongelamento. Snoeck (2003) observou inferioridade do glicerol em comparação com o etilenoglicol e a acetamida em preservar a integridade estrutural dos espermatozoides equinos da raça Mangalarga Marchador. Para o parâmetro função da membrana plasmática, os resultados indicaram que numericamente os diluidores que possuíam a acetamida em sua

formulação tenderam a preservar melhor a membrana plasmática dos espermatozoides dos garanhões da raça Mangalarga Marchador, em relação ao glicerol e ao etilenoglicol.

As amidas têm apresentado resultados promissores, estando sua eficiência relacionada ao seu baixo peso molecular, quando comparadas ao glicerol, permitindo maior permeabilidade nas membranas plasmática e acrossomal, ocasionando menor estresse osmótico aos espermatozoides (Medeiros et al., 2002). A penetração do glicerol na célula espermática, ou sua subsequente saída, pode afetar as membranas celulares por resultarem em injúrias que tornam os espermatozoides inférteis, ainda que possuam motilidade pós-descongelamento (Amann e Pickett, 1987). A utilização de soluções de dimetilformamida em concentrações de 2 a 5% melhorou significativamente a maioria dos parâmetros espermáticos, avaliados *in vitro*, após o descongelamento, quando comparados com as soluções contendo glicerol entre 2 a 5% (Medeiros et al., 2002; Vidament et al., 2002).

Gomes et al. (2002) demonstraram que as amidas são crioprotetores viáveis na criopreservação do sêmen de garanhões com maior sensibilidade espermática ao congelamento, melhorando os parâmetros espermáticos, avaliados *in vitro*, após o descongelamento, de reprodutores da raça Mangalarga Marchador. Esses pesquisadores demonstraram que a dimetilformamida a 5% foi superior ao glicerol a 5%, à metilformamida a 5% e à dimetilacetamida a 3% na preservação da motilidade espermática total, e similar à metilformamida na preservação da motilidade espermática progressiva.

O sucesso da criopreservação do sêmen equino depende das interações entre diluidor, crioprotetor e curvas de resfriamento e descongelamento, buscando

minimizar os danos causados pelo choque térmico, formação de cristais de gelo e desidratação celular (Jasko, 1994; Heitland et al., 1996). A escolha da curva de congelamento apropriada depende do diluidor utilizado (Graham, 1996b), sendo que para os diluidores à base de leite e gema de ovo, há necessidade de resfriamento controlado (-0,3°C/minuto até 5°C) antes do congelamento em vapor de nitrogênio (Cochran et al., 1984). Martin et al. (1979), utilizando o diluidor lactose-EDTA-gema de ovo, não observaram diferenças na motilidade espermática pós-descongelamento quando comparadas as curvas lenta e rápida de resfriamento durante o processo de criopreservação.

Atualmente, as pesquisas envolvendo tecnologia de congelamento do sêmen equino procuram incluir métodos simples e acurados de avaliação da qualidade espermática após o descongelamento. A avaliação da motilidade espermática tem valor limitado na predição da fertilidade do garanhão (Christensen, 1995) e, mesmo quando a morfologia e a motilidade espermática são satisfatórias, a fertilidade pode ser insatisfatória (Voss et al., 1981). Neild et al. (2000) consideraram que a predição da qualidade espermática pode ser melhorada caso sejam utilizados parâmetros adicionais de avaliação baseados nas características funcionais dos espermatozoides, como por exemplo o teste hiposmótico, que avalia a integridade funcional da membrana plasmática. O teste hiposmótico é mais conclusivo do que as colorações supravitais que avaliam a integridade estrutural dos espermatozoides, pois, diversos eventos que ocorrem durante a fecundação, como a capacitação espermática, a reação acrossômica e a fusão gamética não irão ocorrer se a membrana plasmática estiver estruturalmente intacta, mas bioquimicamente inativa (Correa e Zavos, 1994). O teste hiposmótico torna-se mais efetivo quando combinado com outros métodos de avaliação espermática, como a

carboxifluoresceína e o iodeto de propídeo, que avaliam a integridade estrutural dos espermatozoides (Garner et al., 1986). A utilização de testes *in vitro*, que melhor avaliem o potencial fecundante do sêmen congelado equino, tem grande importância no estudo de métodos alternativos de criopreservação.

A determinação da resistência osmótica é crítica para o entendimento das capacidades biofísicas dos espermatozoides durante os processos de congelamento e descongelamento. Uma vez que a resistência osmótica do espermatozoide equino for determinada, este conhecimento pode ser utilizado para o entendimento do comportamento das membranas e para modificar os métodos atuais de criopreservação, o que poderia aumentar a fertilidade dos espermatozoides equinos após o descongelamento (Pommer et al. 2002).

O presente trabalho teve como objetivos: verificar os danos causados às células espermáticas em função da forma de adição, em única ou múltiplas etapas, de 5% de dimetilformamida ao meio diluidor base, verificar os danos causados à célula espermática em função da curva de congelamento utilizada, com ou sem resfriamento controlado prévio, e avaliar o grau de lesão dos espermatozoides nas diferentes etapas do congelamento. As hipóteses levantadas são que a introdução gradativa da dimetilformamida a 5% ao meio diluidor base é menos lesiva, quando comparada à introdução em uma única etapa, na preservação da qualidade espermática, avaliada *in vitro*, pós-descongelamento, e que a curva de congelamento, com resfriamento controlado prévio é mais eficaz na preservação da viabilidade espermática equina, avaliada *in vitro*, quando comparada à curva de congelamento sem resfriamento prévio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vantagens e desvantagens da criopreservação espermática eqüina

Segundo Amann e Pickett (1987) e McKinnon et al. (1996), as principais vantagens da criopreservação do sêmen eqüino são a redução do uso de garanhões geneticamente inferiores; a possibilidade de uso de garanhões, quando esses se encontram em competições hípcas, em recuperação de injúrias ou doenças, ou mesmo após a interrupção de sua capacidade reprodutiva ou óbito; os baixos custos de transporte de um botijão criogênico quando comparados aos custos de transporte de um garanhão; além da não necessidade do transporte de éguas para serem cobertas, o que diminui a prevalência de doenças sexualmente transmissíveis.

As principais desvantagens são que, para muitos garanhões, os protocolos de congelamento atualmente disponíveis não resultam em taxas de prenhez satisfatórias, os custos do processo de congelamento são elevados e algumas associações de raça não permitem a utilização desta biotecnologia.

2.2 Aspectos fundamentais da criopreservação

Segundo Amann e Pickett (1987) o espermatozóide, para fecundar um ovócito, deverá manter no mínimo quatro atributos: motilidade progressiva; enzimas acrossomais intactas, fundamentais ao processo de fusão gamética; metabolismo para a produção de energia e proteínas do plasma seminal, importantes para a sobrevivência espermática dentro do trato reprodutivo feminino e para a fusão gamética. A destruição dos componentes espermáticos, associados a uma ou mais dessas funções, irá reduzir ou abolir o potencial fecundante dos espermatozoides.

Atualmente, mesmo com os melhores protocolos de criopreservação, a taxa de sobreviventes após o descongelamento, em média, não é superior a 50%. Além disso, os espermatozoides sobreviventes são qualitativamente inferiores após o descongelamento (Watson, 1995).

Durante o processo de resfriamento, de 20°C a 8°C, ocorre uma série de mudanças, parcialmente irreversíveis que, coletivamente, são denominadas de choque térmico. O espermatozóide eqüino é extremamente sensível ao choque térmico, que é evidenciado pelo movimento circular fechado ou retrógrado, perda prematura da motilidade, aumento da permeabilidade das membranas, decréscimo da produção energética e perda de íons e moléculas intracelulares. As injúrias aos espermatozoides, ocasionadas pelo choque térmico, relacionam-se diretamente com a curva de resfriamento adotada e ocorrem quando os espermatozoides são rapidamente resfriados da temperatura ambiente até 0°C (Jasko, 1994), podendo ser causadas diretamente pelo comprometimento de estruturas celulares, como por exemplo a ruptura das membranas, ou indiretamente pela alteração das funções celulares (Amann e Pickett, 1987).

As injúrias do choque térmico têm início primariamente nas membranas plasmáticas espermáticas. À temperatura corporal, as membranas plasmáticas estão na forma de um mosaico fluido de lipídeos e proteínas. As proteínas estão livres para se movimentarem dentro da bicamada fluida de fosfolipídeos, e funções próprias da membrana requerem que as proteínas sejam capazes de se movimentarem no seu interior. À medida que as membranas espermáticas são resfriadas, as propriedades da bicamada fluida de fosfolipídeos se modificam e os fosfolipídeos similares, dentro dessa membrana, começam a se coalescerem formando domínios. Esses domínios excluem os componentes protéicos da

membrana, restringindo a mobilidade e alterando a funcionalidade da mesma. Essas mudanças se iniciam nas membranas plasmáticas, que envolvem a cabeça dos espermatozoides, e injúrias posteriores podem romper membranas acrossomais ou, até mesmo, as membranas intracelulares (Jasko, 1994).

Diversos fatores contribuem para o sucesso da criopreservação espermática, dentre os quais se destaca a curva de congelamento. Uma curva de congelamento ótima não deverá ser muito lenta, para que a alta concentração de sais intracelulares, devido à desidratação, não danifique os espermatozoides; e nem muito rápida para que não ocorra a formação de gelo intracelular. O descongelamento também limita o sucesso de um programa de criopreservação. Recomenda-se que quando o congelamento for rápido, o descongelamento também deverá ser rápido e, quando o congelamento for lento, o descongelamento também deverá ser lento (Amann e Pickett, 1987; Leibo e Bradley, 1999). Quando o congelamento é realizado em uma velocidade muito rápida, não há tempo suficiente para que ocorra adequada desidratação, havendo assim a formação de grandes cristais de gelo no meio intracelular. Daí, a necessidade de uma velocidade de descongelamento também rápida para que não ocorra a recristalização, com consequente dano à célula espermática. Quando o congelamento é realizado lentamente, o descongelamento também deverá ser lento, pois há a necessidade de maior tempo para que a célula se reidrate, preservando sua viabilidade morfo-funcional (Mazur, 1984).

As membranas espermáticas que são afetadas pela criopreservação incluem a membrana plasmática, as membranas acrossomais externa e interna, as membranas mitocondriais interna e externa e a membrana nuclear. As membranas plasmática e acrossomal externa são

regionalmente diferentes. Recentemente, uma hipótese de assimetria bilaminar tem sido considerada importante na função da membrana plasmática. A quebra na assimetria parece estar associada ao desenvolvimento de um folheto externo mais fluido da membrana plasmática, que é uma característica dos espermatozoides capacitados. Essa membrana é fusogênica, permeável e instável, atribuindo à célula uma longevidade menor. Desde que as enzimas são dependentes da temperatura, a ruptura na assimetria bilaminar pode estar associada com o resfriamento e o reaquecimento. As proteínas do citoesqueleto exibem despolarização e repolarização dependentes da temperatura, o que pode ter implicações significativas no processo de criopreservação espermática (Watson, 1995).

Embora a redução na motilidade espermática possa ser explicada pelas mudanças no transporte ativo e na permeabilidade da membrana plasmática na região da cauda, também é possível que alterações na viabilidade de energia ou injúrias aos elementos do axonema possam contribuir para esta causa. Além disso, a lesão na estrutura mitocondrial, ocasionada pela criopreservação reduz a produção de ATP (Watson, 1995).

Para um melhor entendimento de como as mudanças de temperatura danificam os espermatozoides, há necessidade do entendimento da sua estrutura.

2.2.1 Estrutura espermática

Os espermatozoides são formados pela cabeça, que acomoda o núcleo, uma estrutura que contém cromatina altamente condensada e o acrossoma, que contém enzimas. A membrana acrossomal é designada para se fundir com a membrana plasmática e liberar as enzimas acrossomais, que auxiliam na penetração do espermatozoide na zona pelúcida do ovócito.

O colo (pescoço) conecta a cabeça espermática à cauda, que é dividida em três regiões especializadas: peça intermediária, peça principal e peça terminal. A cauda espermática contém um axonema composto por microtúbulos na configuração (9+2), um par de microtúbulos central e nove pares periféricos circundados pelas fibras externas densas. A peça intermediária está envolvida na produção de energia por acomodar as mitocôndrias e o flagelo está envolvido com a motilidade. A cabeça, o colo, a peça intermediária, a peça principal e a peça terminal são envolvidos pela membrana plasmática, composta por vários lipídeos e proteínas. O axonema, as mitocôndrias e a membrana plasmática sofrem alterações durante o processo de congelamento, determinando que os espermatozoides descongelados mantenham a motilidade progressiva por um curto período de tempo (Amann e Pickett, 1987; Amann, 1991; Squires et al., 1999).

Sob a perspectiva do choque térmico, as estruturas membranosas são as mais relevantes. Tais estruturas incluem a membrana plasmática, as membranas acrossomais e mitocondriais e a membrana nuclear. As membranas são compostas de lipídeos e proteínas que se organizam em uma bicamada lipídica, formada predominantemente por fosfolipídeos e o colesterol. As proteínas são classificadas como integrais ou periféricas, sendo essas últimas facilmente dissolvidas em água ou diluidores seminais, enquanto que as primeiras são fortemente aderidas e só são destacadas da membrana por solventes ou detergentes. Essas proteínas servem como poros ou canais da membrana (Amann e Pickett, 1987).

A distribuição dos fosfolipídeos na membrana não permite que a água e que moléculas dissolvidas em água passem pela membrana plasmática com facilidade; conseqüentemente, essas moléculas passam ou são transportadas através dos poros ou

canais criados pelas proteínas integrais. Mudanças no arranjo dos fosfolipídeos são ocasionadas por injúrias na membrana e permitem a passagem rápida de substâncias que, normalmente, a atravessam vagarosamente. Em condições normais, a passagem de soluções hidrofílicas é mínima ou nula em regiões da membrana desprovidas de poros (Amann e Pickett, 1987).

As proteínas funcionam como bombas iônicas removendo cálcio, sódio e outros íons de dentro da célula e agem como receptores para a ligação dos espermatozoides ao ovócito. Devido à importância da membrana na manutenção iônica celular, as injúrias da membrana resultam em morte celular. Um espermatozoide pode se tornar infértil por numerosas razões: perda ou dano acrossomal, injúrias à membrana plasmática, função mitocondrial insatisfatória e perda da motilidade (Squires et al., 1999).

2.2.2 Mudanças que ocorrem durante o congelamento e o descongelamento

A fluidez das membranas é dada pela capacidade dos fosfolipídeos em se movimentarem lateralmente e, dentre os fatores que a afetam, a temperatura é o mais relevante. Uma série de mudanças ocorre na natureza biofísica dos espermatozoides, especialmente quando em temperaturas inferiores a 20°C. Devido à natureza heterogênea das membranas espermáticas e ao intervalo de temperatura no qual as mudanças podem ocorrer, muitas dessas se iniciam durante o processo de resfriamento e continuam durante o processo de congelamento (Amann e Pickett, 1987).

Qualquer dano espermático durante o processo de resfriamento será exacerbado durante os processos de congelamento e descongelamento. As principais fontes de injúrias durante o processo de criopreservação incluem a formação de

cristais de gelo, intra e extracelular; as mudanças intracelulares ocasionadas pela desidratação espermática e a distorção das membranas celulares devido à desidratação e à saída de moléculas de dentro dos espermatozoides, após o descongelamento (Amann e Pickett, 1987).

Quando uma suspensão espermática é resfriada abaixo de 5°C, inicialmente as células espermáticas e o meio que as envolve permanecem descongelados, pois o ponto de congelamento dos diluidores e do líquido intracelular é a -5°C. Entre -5°C e -15°C, começa a formação de cristais de gelo no meio diluidor e as células espermáticas continuam resfriadas, sendo a membrana plasmática uma espécie de barreira, impedindo a entrada dos cristais de gelo extracelulares nas células espermáticas. À medida que a água extracelular congela, os sais excluídos dos cristais de gelo se acumulam em concentrações crescentes no líquido ainda não congelado, aumentando o gradiente osmótico no meio extracelular e promovendo a desidratação das células espermáticas (Amann e Pickett, 1987).

A crioinjúria acontece devido a dois principais estresses da criopreservação: mudanças na temperatura e formação e dissolução dos cristais de gelo e suas consequências. Desde que o processo da criopreservação envolve a redução e o retorno das células à temperatura corporal, tanto o estresse de resfriamento como o de reaquecimento estão incluídos como causas potenciais de estresse (Watson, 1995).

O estresse osmótico, associado à adição e à remoção do crioprotetor, tem sido estudado e sugere-se que o efeito osmótico das concentrações molares de crioprotetores pode resultar em injúrias das membranas durante a adição ou remoção desses, dependendo da permeabilidade das membranas celulares ao crioprotetor (Watson, 1995). Gao et al. (1995) demonstraram que quando o espermatozoide

humano foi exposto à solução contendo 1M de glicerol, adicionado em uma única etapa, a excursão do volume celular excedeu limites toleráveis durante a adição do crioprotetor. Esses pesquisadores demonstraram que o estresse pôde ser reduzido a limites toleráveis pela adição e remoção do crioprotetor em várias etapas.

2.3 Diluidores seminais

Segundo Squires et al. (1999), é difícil determinar o melhor diluidor de congelamento na espécie equina, pois a comparação entre estudos não é válida, devido à influência dos ganhões, aos diferentes sistemas de envase e curvas de resfriamento e reaquecimento, e à natureza subjetiva da avaliação da motilidade após o descongelamento.

Para se resfriar ou congelar as células espermáticas com sucesso, diluidores seminais são utilizados para proteger os espermatozoides do choque térmico e dos efeitos do congelamento e descongelamento. Os efeitos ocasionados pelo choque térmico têm sido minimizados pela adição de macromoléculas ao meio diluidor. Devido à sua composição protéica e capacidade de proteção, os diluidores à base de leite têm sido largamente utilizados para proteger os espermatozoides contra o choque térmico (Jasko, 1994). A gema de ovo, ou a combinação da gema de ovo e leite é comumente utilizada (Graham, 1996b).

Após Phillips e Lardy (1940) reportarem o efeito crioprotetor da gema de ovo contra os efeitos deletérios ocasionados pelo choque térmico aos espermatozoides, a sua utilização, na criopreservação espermática de mamíferos, tornou-se difundida. A gema de ovo minimiza a perda espermática de fosfolípidos durante o resfriamento, sendo a interação existente entre os componentes da gema de ovo e as membranas espermáticas a responsável por seu efeito crioprotetor (Jasko, 1994). Watson (1995)

afirma que a gema de ovo é o agente mais efetivo na proteção espermática contra o choque térmico, não sendo igualmente específico para todas as espécies.

Evidências de estudos criomicroscópicos demonstraram que a gema de ovo protege os espermatozóides de ovinos contra as lesões de membrana e a perda de motilidade induzidas abaixo do ponto de congelamento extracelular, -20°C (Holt et al., 1992). Melo et al. (2004) observaram que diluidores contendo gema de ovo preservam os espermatozóides incubados a 5°C por um período de tempo superior aos diluidores contendo leite desnatado. Segundo Watson (1995), a proteção é devido ao tipo de lipídeos existentes na gema e a emulsificação aumenta a sua atividade, incrementando a interação com a superfície da membrana. Watson (1976) demonstrou que o componente ativo da gema de ovo é uma proteína de baixa densidade. A fração da lipoproteína de baixa densidade da gema de ovo (LDL), especialmente os fosfolipídeos dentro dessa fração, têm sido identificados como componentes efetivos na proteção espermática.

O mecanismo exato pelo qual esses lipídeos protegem as membranas espermáticas é desconhecido. Contudo, perdas de fosfolipídeos das membranas espermáticas ocorrem durante o choque térmico e a adição da gema de ovo previne essas perdas ou modula seus efeitos prejudiciais (Parks e Graham, 1992). Juliani et al. (2004), ao testarem, *in vitro*, os efeitos da adição de várias concentrações de LDL (2,5%, 10%, 20%), ao meio diluidor contendo glicerol ou dimetilformamida na manutenção da motilidade espermática equina pós-descongelamento, não submeteram os tratamentos com 2,5% de LDL ao congelamento, devido à motilidade ter decrescido a valores inferiores a 15%, antes do envase. Esses pesquisadores observaram não haver diferença entre os tratamentos submetidos ao congelamento, embora uma

tendência de superioridade tenha sido observada quando 10% ou 20% de LDL foram associadas à dimetilformamida.

Combes et al. (2000) demonstraram que as ciclodextrinas podem ser utilizadas para incorporar o colesterol à membrana plasmática dos espermatozóides equinos, o que confere proteção aos espermatozóides, durante o processo de criopreservação.

A maioria dos diluidores de congelamento utiliza o glicerol ou uma combinação de glicerol e um ou mais açúcares como crioprotetores. Outros componentes dos meios de congelamento incluem o EDTA, detergentes, estabilizadores do pH e antibióticos (Graham, 1996b).

O EDTA se liga aos íons cálcio, prevenindo a entrada de cálcio extracelular nas células espermáticas (Graham, 1996b). Tem sido demonstrado que o excesso de cálcio intracelular lesa as células durante o choque térmico (Watson, 1981).

Os detergentes solubilizam os lipídeos e as lipoproteínas da gema de ovo, aumentando as interações destes componentes com a membrana plasmática dos espermatozóides (Pickett e Amann, 1993).

O uso de antibióticos nos diluidores de sêmen resfriado ou congelado minimiza a contaminação no trato genital da égua (Kenney, 1975) e os efeitos dos metabólitos bacterianos sobre a motilidade espermática (Rideout et al., 1982). Santos et al. (2003) estudaram os efeitos de diferentes antibióticos e suas associações: penicilina, estreptomicina, gentamicina e ampicilina sobre a motilidade e a integridade espermáticas e controle bacteriano de sêmen congelado equino. Esses pesquisadores não observaram diferenças entre os antibióticos e suas associações sobre a motilidade espermática e integridade de membrana plasmática pós-descongelamento, e sugerem que esses resultados são, provavelmente,

decorrentes do equilíbrio osmótico propiciado com o diluidor de congelamento, o meio MP50, que contém sistemas tampões e constituintes ou substâncias energéticas, protéicas, crioprotetores e antimicrobianos.

Os agentes crioprotetores são substâncias químicas que auxiliam na proteção e, conseqüentemente, na sobrevivência celular, protegendo as células das grandes distorções da geometria celular e do meio que acompanham os processos de congelamento e descongelamento (Fahy et al., 1990).

A escolha do melhor crioprotetor parece ser um problema de tentativa e erro. Isso se deve, parcialmente, porque uma explicação completa e satisfatória do mecanismo de ação dos crioprotetores ainda não existe. O ambiente químico e osmótico onde os espermatozoides são preservados influencia a sobrevivência espermática pós-descongelamento. A escolha da natureza dos crioprotetores e aditivos como açúcares, quelantes de cálcio, antioxidantes e proteínas do leite ou da gema de ovo têm demonstrado influência profunda na sobrevivência espermática (Holt, 2000b).

Os crioprotetores são componentes essenciais de um meio diluidor de congelamento e são classificados como intracelulares ou extracelulares, dependendo da sua capacidade de penetrar na membrana plasmática. Lactose, sacarose e rafinose são usualmente utilizados como crioprotetores extracelulares. À medida que a água sai das células e começa a congelar, a concentração de soluto extracelular aumenta; esses açúcares que se acumulam não penetram nas células, criando uma força osmótica para mover a água para fora das células (Jasko, 1994). O glicerol, juntamente com outras substâncias, pertence ao grupo de crioprotetores que penetra no citoplasma celular (Holt, 2000a).

Lovelock e Polge (1954) propuseram que os efeitos protetores do glicerol estavam

relacionados com suas propriedades coligativas, redução do ponto de congelamento, com conseqüente diminuição da concentração de eletrólitos na fração ainda não congelada. Entretanto, essa não é a única forma pela qual o glicerol pode proteger as células durante o congelamento, sendo evidente que ele é, de alguma maneira, citotóxico aos espermatozoides (Holt et al., 2000b).

O glicerol é capaz de se inserir na membrana bilaminar, contribuindo para a alteração das propriedades das membranas celulares, por meio da indução de mudanças na estrutura lipídica e portanto, a estabilidade e a permeabilidade das membranas celulares poderiam ser alteradas (Hammersted e Graham, 1992). A capacidade fusogênica das membranas e a resposta aos padrões de transdução de sinais também poderão ser afetadas por essas mudanças, contribuindo assim para a redução da longevidade espermática pós-descongelamento, devido à indução da capacitação espermática (Watson, 1995).

O glicerol pode alterar bioenergeticamente os espermatozoides, provavelmente interferindo no balanço entre a síntese e a utilização de ATP, comprometendo o controle metabólico dos processos celulares íon dependentes, ativando inadequadamente fosfolipases e proteases, levando a injúrias celulares irreversíveis. Enquanto o glicerol é essencial para a sobrevivência espermática durante o processo de congelamento, sua incorporação em altas concentrações são prejudiciais à fertilidade espermática, sendo comumente utilizado em concentrações que variam de 3 a 6% nos diluidores de congelamento, provavelmente trabalhando em sinergismo com a gema de ovo na proteção das membranas espermáticas, durante os processos de congelamento e descongelamento (Jasko, 1994).

Medeiros et al. (2002) compararam a integridade acrossomal pós-

descongelamento de espermatozoides equinos criopreservados, com crioprotetores à base de amidas e glicerol, e observaram melhor eficiência das amidas em relação ao glicerol, sugerindo que a eficiência das amidas pode estar relacionada a seu menor peso molecular em relação ao glicerol, o que as confere maior permeabilidade na membrana plasmática e acrossomal, causando, conseqüentemente, menor dano osmótico aos espermatozoides.

Alvarenga et al. (2004), objetivando verificar se a utilização da dimetilformamida poderia reduzir as variabilidades clássicas existentes entre raças e ganhões, congelaram os ejaculados de 55 ganhões de diferentes raças (Quarto de Milha, Mangalarga Marchador, Árabe), utilizando o diluidor INRA 82 como meio base, adicionado a 5% de glicerol ou dimetilformamida. Esses pesquisadores observaram maior percentual de motilidade espermática total pós-descongelamento quando a dimetilformamida foi utilizada como crioprotetor, quando comparada com o glicerol (50,3% x 33,4%, respectivamente); a motilidade espermática progressiva também foi superior no protocolo da dimetilformamida (18,9% x 15,3%). Além disso, a dimetilformamida foi superior ao glicerol na maioria dos ganhões estudados. O percentual de ganhões com boa motilidade espermática total pós-descongelamento, ou seja, aqueles que apresentaram motilidade total superior a 40%, foi de 80% com a utilização da dimetilformamida e de 38% com utilização do glicerol. Um incremento significativo nos parâmetros de motilidade espermática foi observado em todas as raças com a utilização da dimetilformamida, em parâmetros avaliados *in vitro*.

2.4 Métodos de avaliação espermática

Desde a virada do século, cientistas têm intensificado as pesquisas na busca de ensaios laboratoriais que, acuradamente,

possam prever a fertilidade de uma amostra de sêmen. Tal meta ainda não foi atingida devido à complexa natureza do problema, que, além dos entraves em se definir e mensurar a fertilidade, enfrentam as dificuldades envolvidas na avaliação da natureza complexa dos espermatozoides. Devido às várias particularidades que um espermatozoide requer para fecundar um ovócito, ensaios laboratoriais, que avaliam uma única característica, irão falhar em detectar defeitos espermáticos, superestimando o número de espermatozoides férteis em uma amostra de sêmen (Graham, 1996a).

Uma boa análise laboratorial deverá incorporar os seguintes atributos: objetividade, repetibilidade, acurácia, viabilidade econômica e tempo de execução (Graham et al., 1980). Embora os testes laboratoriais não determinem a fertilidade real de uma amostra de sêmen, eles permitem prever quais amostras são mais prováveis de possuir baixa fertilidade (Amann, 1989).

Na maioria das espécies domésticas, incluindo a espécie equina, para se fecundar um ovócito, o espermatozoide deverá possuir acrossoma intacto no momento que precede a fecundação. Se houver perda acrossomal, devido às lesões de membrana durante a criopreservação, ou durante o trânsito espermático no trato reprodutivo feminino, o espermatozoide não poderá se ligar à zona pelúcida do ovócito (Graham, 1996b).

Cross et al. (1989) reportaram que a lectina aglutinada do *Psium sativum*, uma proteína oriunda da ervilha comum, liga-se aos conteúdos acrossomais de espermatozoides de várias espécies e que, ao associá-la com uma sonda fluorescente, a presença de acrossomas intactos pode ser determinada por meio de um microscópio de fluorescência. Graham (1996a) sugeriu uma superioridade da lectina do amendoim,

Arachis hypogea, quando comparada à aglutinina *Psium sativum*, por corar o acrossoma equino com uma intensidade de brilho maior e com menos colorações não específicas de outros componentes espermáticos.

Garner et al. (1986) descreveram o uso de duas sondas fluorescentes, o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídeo (IP), na avaliação da integridade das membranas espermáticas de touros, varrões, garanhões, camundongos e homens. O fluoróforo diacetato de carboxifluoresceína penetra na célula, mas é hidrolisado por esterases intracelulares não específicas e, o produto resultante, 6-carboxifluoresceína, não atravessa a membrana, sendo retido dentro das estruturas celulares que contêm membranas intactas, atribuindo-lhes fluorescência verde em toda a sua extensão. O iodeto de propídeo é um fluoróforo núcleo ácido específico com fluorescência vermelha e, não penetra células com membranas intactas, consequentemente, não cora o núcleo de espermatozóides viáveis. Infelizmente, o procedimento implica na necessidade de um citômetro de fluxo, um recurso não disponível na maioria dos laboratórios, e a avaliação por meio de microscopia de fluorescência não é possível, devido à maioria dos espermatozóides continuarem vivos durante esse teste.

Harrison e Vickers (1990), descreveram o uso de baixas concentrações de formoldeído para imobilizar os espermatozóides vivos, sendo possível a avaliação das células por meio de microscopia de fluorescência, concluindo que a inclusão de baixas concentrações de formoldeído imobiliza as células intactas, permitindo a contagem fácil das categorias, não afetando o acúmulo de carboxifluoresceína dentro do citoplasma espermático ou das organelas. O efeito imobilizante do formoldeído é presumivelmente mediado por interações reversíveis com o grupo de amino na

superfície espermática. Uma pequena redução foi observada nas proporções de células intactas após cem minutos de coloração (59,7% intactos comparados com 64,2% originalmente), comparada a uma redução similar observada na suspensão diluída que também foi mantida por cem minutos antes da coloração. Esse declínio foi atribuído às mudanças senescentes inerentes, mais do que qualquer efeito prejudicial da solução de coloração.

A sensibilidade deste método de avaliação da integridade da membrana plasmática pode ser demonstrada pelos efeitos do choque térmico. Curvas rápidas de resfriamento até 0°C resultaram em mais de 97% das células sendo permeáveis às sondas fluorescentes. Acrossomas também foram penetrados pelos fluorocromos fluoróforo, enquanto que a maioria das mitocôndrias permaneceram intactas. A fluorescência da peça intermediária foi interpretada como o acúmulo de carboxifluoresceína dentro das mitocôndrias intactas, como resultado da ação de esterases dentro dessas organelas. A carboxifluoresceína é produzida e retida dentro da mitocôndria e acrossoma, assim como dentro do citoplasma de todas as espécies examinadas, podendo ser utilizada para avaliar a integridade das membranas das organelas, assim como da membrana plasmática. A membrana plasmática é intrinsecamente mais instável do que a membrana acrossomal externa e parece ser, consideravelmente, mais instável do que a membrana mitocondrial (Harrison e Vickers, 1990).

Em experimento conduzido por Harkema e Boyle (1992), a carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídeo (IP) foram avaliados para estabelecer seu valor como indicadores da qualidade espermática em eqüinos. Esses pesquisadores concluíram que, tanto no sêmen *in natura*, quanto no submetido a algum tipo de tratamento, a informação quantitativa sobre a integridade espermática fornecida pelo CFDA e PI

correlacionava bem com a motilidade total e que, como método de avaliação da sobrevivência espermática antes e após o descongelamento, a coloração com o CFDA e o IP parece apresentar vantagens sobre a avaliação visual, sendo os resultados menos predispostos a avaliações subjetivas e menos dependentes da temperatura e tempo decorrido após o descongelamento.

Uma membrana funcional é essencial para que a fecundação ocorra, e portanto, é uma característica essencial para se analisar. O teste hiposmótico (HO) permite uma avaliação simples da funcionalidade da membrana e os resultados obtidos de experimentos previamente conduzidos demonstraram que os ganhões com percentual inferior a 40% de células reativas ao teste hiposmótico, no sêmen *in natura*, apresentavam fertilidade duvidosa. O teste hiposmótico não esteve correlacionado com o percentual de éguas prenhas, mas demonstrou tendência a correlacionar-se com o número de serviços por prenhez, podendo ser um método adicional na avaliação da fertilidade dos ganhões (Neild et al., 2000).

O teste hiposmótico é baseado no fato de que o transporte de fluidos ocorre através da membrana intacta, sob condições hiposmóticas, até que o equilíbrio seja alcançado. Devido ao aumento de fluxo, as células se expandem principalmente na cauda, favorecendo alterações na morfologia da região da cauda, indicando que o espermatozóide apresentava a membrana plasmática funcionalmente íntegra antes da realização do teste (Jeyendran et al., 1984). A fecundação não irá ocorrer se o espermatozóide apresentar membrana bioquimicamente inativa, mesmo que estruturalmente intacta, sendo o teste hiposmótico um ensaio mais útil do que as colorações supravitalis (Tamuli e Watson, 1992).

Melo e Henry (1999) acreditavam que diferenças na composição da membrana plasmática podem determinar diferentes comportamentos frente ao meio hiposmótico, tornando-se necessário testar vários solutos com o intuito de se determinar e padronizar respostas ao teste hiposmótico em uma espécie animal e, dessa forma, permitir posteriores comparações entre estudos. Esses pesquisadores, estudando o teste hiposmótico adequado para a espécie equina, no sêmen *in natura* e resfriado, testaram duas soluções de açúcares e duas soluções de eletrólitos em água destilada em seis diferentes osmolaridades: frutose, sacarose, citrato de sódio e cloreto de sódio a 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mOsmol/Kg. O teste consistiu na mistura de uma alíquota de 100 microlitros de sêmen em 1,0 mL de cada solução, seguida de incubação, em banho-maria, a 37°C, por trinta minutos. Foi concluído que a solução indicada para se realizar o teste hiposmótico para o sêmen equino, *in natura* ou resfriado, é a de sacarose a 100 mOsmol/Kg, havendo alto grau de associação entre motilidade e integridade funcional da membrana plasmática no sêmen *in natura*. Foi observado que a variabilidade média intra-ensaio mediante o uso da solução de sacarose a 100 mOsmol/Kg indicou alta repetibilidade.

Melo et al. (2004), ao avaliar e comparar a sensibilidade de três testes de integridade de membrana, teste hiposmótico, coloração supravital e técnica da fluorescência, em detectar mudanças, durante a incubação a 5°C, de células espermáticas diluídas em três diferentes meios (Kenney, Baken com 3% de gema de ovo e Baken com 10% de gema de ovo) concluíram que o teste hiposmótico foi o mais eficaz em detectar mudanças da membrana plasmática. Esses pesquisadores observaram que a avaliação da morfologia espermática não foi uma ferramenta valiosa na análise das modificações das células espermáticas equinas durante o período de incubação.

Voss et al. (1981) afirmaram que a avaliação da morfologia espermática não pode ser considerada uma técnica valiosa na avaliação do potencial fecundante dos espermatozoides eqüinos. Esses pesquisadores também demonstraram a existência de baixa correlação entre a motilidade e a fertilidade dos ganhões; conseqüentemente, a longevidade espermática pode ter valor limitado na predição do potencial fecundante de uma amostra de sêmen. Esses autores afirmam que somente os espermatozoides progressivamente móveis possuem capacidade fecundante.

Fundamentalmente, no processo de fecundação, o espermatozoide tem que entrar em contato e penetrar no ovócito. Isso requer receptores espermáticos protéicos intactos para se ligarem à zona pelúcida, desencadeando a reação acrossômica e se ligando à membrana plasmática do ovócito. Ensaio laboratoriais *in vitro*, que avaliam a penetração do espermatozoide em ovócitos homólogos, têm vantagens em relação a outros testes laboratoriais por, simultaneamente, avaliar várias características espermáticas, como motilidade e habilidade de ligação à zona pelúcida e desvantagens, que são a inviabilidade econômica e de tempo para realização desses ensaios, além do fato de que muito poucos espermatozoides são avaliados (Graham, 1996a).

Adicionalmente, as condições nas quais os espermatozoides são avaliados parecem ser muito diferentes das condições *in vivo*, podendo não fornecer resultados representativos da fertilidade natural. Embora a penetração espermática em ovócitos de hamster livres da zona pelúcida não mensure a capacidade do espermatozoide de se ligar e penetrar na zona pelúcida, uma grande barreira ao espermatozoide, ela avalia a capacidade dos espermatozoides de sofrerem a reação

acrossômica normal e penetrarem no ovócito (Graham, 1996a).

A análise simultânea de várias características espermáticas pela citometria de fluxo tem várias vantagens sob a maioria das outras análises, oferecendo a possibilidade de análise de milhares de células em um curto espaço de tempo, inferior a um minuto, com precisão e sem a preparação extensiva dos espermatozoides. Resultados na utilização dessa técnica para avaliar a viabilidade espermática e a integridade acrossomal, simultaneamente, obtiveram alta correlação com a fertilidade ($r = 0,658$; Graham, 1996a), enquanto que a correlação existente entre o percentual de motilidade espermática e a fertilidade foi de $r = 0,219$ significância e, entre a fertilidade e a habilidade do espermatozoide de penetrar em ovócitos de hamster livres da zona pelúcida foi de $r = 0,149$. Esses dados devem ser analisados com cuidado, devido ao baixo número de inseminações realizadas. Todavia, indicam que análises que mensurem várias características espermáticas simultaneamente podem ter alta correlação com a fertilidade a campo (Graham, dados não publicados, citados por Graham, 1996a).

2.5 Etapas do congelamento

Os ganhões que tiveram longo período de descanso sexual deverão ter suas reservas extragonadais estabilizadas por meio de coletas de sêmen diárias, visando a remoção dos espermatozoides de qualidade inferior, antes de se procederem a coletas para o congelamento (Jasko, 1994).

Após a avaliação macroscópica do ejaculado, o sêmen será diluído e preparado para a centrifugação. Para o sêmen envasado em palhetas plásticas de 0,5, 1,0 ou 4,0 mL, a centrifugação espermática ou a coleta fracionada da fração rica em espermatozoides é rotina no processo de criopreservação. A centrifugação é

necessária para remover o plasma seminal e concentrar os espermatozoides (Jasko et al., 1994; Squires et al., 1999). O plasma seminal é deletério aos espermatozoides eqüinos e sua remoção exerce efeito benéfico. Entretanto, o plasma seminal contém componentes que são importantes para a sobrevivência espermática, sendo a sua completa retirada não aconselhável (Pickett et al., 1975).

O plasma seminal influencia os espermatozoides durante o processo de armazenamento de diferentes maneiras, dependendo das proporções de diluição, duração do armazenamento, dentre outros fatores. Efeitos benéficos têm sido reportados após a adição do plasma seminal antes do congelamento. Porém, resultados contraditórios demonstram que um curto período de exposição (quinze minutos) do espermatozoide ao plasma seminal, não teve efeito sob a viabilidade espermática e a exposição prolongada (duas, quatro ou seis horas) a 5 ou 20% do plasma seminal no diluidor de congelamento foi deletéria aos espermatozoides. Há algumas evidências de que a fração rica em espermatozoides do ejaculado eqüino parece ser mais adequada ao congelamento do que o ejaculado total ou as frações com baixa motilidade espermática (Katila e Kareskoski, 2006).

O fluido seminal é um veículo necessário para o movimento dos espermatozoides no trato genital de machos e fêmeas. O plasma seminal facilita o transporte, a proteção e a nutrição dos espermatozoides no trato genital feminino (Katila e Kareskoski, 2006).

Todd et al. (2001) observaram melhor motilidade espermática progressiva após 24 e 48 horas do sêmen eqüino resfriado nas amostras de sêmen contendo 1,25 ou 2,5% de plasma seminal do que em amostras contendo 10%.

A centrifugação de todo o ejaculado, assim como a coleta fracionada e a utilização apenas da fração rica em espermatozoides são benéficos à motilidade espermática durante o armazenamento do sêmen (Katila e Kareskoski, 2006).

Várias enzimas têm sido identificadas no plasma seminal dos garanhões e esforços têm sido feitos na tentativa de determinar correlações entre as atividades de certas enzimas e a qualidade do sêmen (Katila e Kareskoski, 2006).

Em espermatozoides humanos, algumas enzimas presentes no plasma seminal se ligam com grande afinidade à superfície espermática e podem desempenhar uma função na modificação da superfície espermática precedente à fertilização (Barbieri et al., 1996).

Enzimas presentes no plasma seminal protegem os espermatozoides das injúrias oxidativas causadas pela produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) (Katila e Kareskoski, 2006). Injúrias causadas pela criopreservação são fontes significativas de ROS (Ball et al., 2001).

Segundo Amann e Pickett (1987) a centrifugação não é um processo inócuo e os efeitos deletérios podem ser minimizados adotando-se uma baixa força de centrifugação e diluindo-se os espermatozoides antes de centrifugá-los. Squires et al. (2000) concluíram que a centrifugação espermática antes do resfriamento, quando comparada à centrifugação após o resfriamento, foi mais eficiente em preservar a motilidade progressiva do sêmen eqüino avaliada após o descongelamento.

Dell'Aqua Júnior e Papa (2001) ao pesquisarem a eficácia de três diferentes diluidores de centrifugação (Kenney, 50% de Kenney + 50% de Ringer com lactato de sódio e Ringer com lactato de sódio) e

diversos tempos e intensidades de centrifugação (600 G/3 minutos; 600 G/5 minutos; 600 G/10 minutos; 800 G/3 minutos; 800 G/5 minutos, 800 G/10 minutos, 100 G/3 minutos, 100 G/5 minutos e 1000 G/10 minutos) sugeriram a utilização da solução de 50% de Kenney + 50% de Ringer com lactato de sódio como diluidor para a centrifugação, numa intensidade de 600 G/10 minutos. Nesse protocolo foram encontradas as menores alterações morfológicas dos espermatozoides, com recuperação espermática em torno de 87% de células após a ressuspensão.

Martin et al. (1979) demonstraram que a diluição dos espermatozoides em diluidor adequado, pré-centrifugação, aumentou a motilidade espermática pós-descongelamento, quando comparada à centrifugação do sêmen *in natura*. Esses pesquisadores obtiveram um incremento ainda maior na motilidade espermática pós-descongelamento quando utilizaram o diluidor lactose-EDTA-gema para ressuspender os espermatozoides após a centrifugação.

O tempo de centrifugação poderá ser alterado, baseando-se na resposta individual de cada ganhão. Tempos maiores de centrifugação resultam em maior recuperação espermática, porém, predispoem os espermatozoides a injúrias mecânicas. Para a maioria dos ganhões, 80% dos espermatozoides podem ser recuperados após a centrifugação sem uma redução da motilidade espermática (Jasko, 1994). Cochran (1984) sugeriram força gravitacional de 400 G durante quinze minutos.

Cochran et al. (1984) concluíram que a diluição com citrato-EDTA foi mais eficaz em preservar os espermatozoides após a centrifugação quando comparada ao meio glicose-EDTA, e que o meio de centrifugação contendo gema de ovo, com

ou sem adição de glicerol, fornece proteção igualmente eficiente, quando comparado com as soluções de glicose. Esses pesquisadores também observaram incremento na motilidade espermática ente zero e trinta a quarenta minutos após a centrifugação, ainda que o sêmen não tenha sido congelado. Essa melhora, durante trinta a quarenta minutos após a centrifugação, é provavelmente resultado da recuperação dos espermatozoides de injúrias transitórias causadas pela centrifugação.

Independentemente do meio de centrifugação utilizado, a literatura é convergente em afirmar que a força gravitacional mínima necessária para a recuperação da maioria dos espermatozoides, durante o tempo de dez a quinze minutos, é desejável para minimizar os danos aos espermatozoides. O percentual de motilidade espermática progressiva após a centrifugação deverá ser similar ao percentual pré-centrifugação e quando estiver significativamente reduzido, o tempo, a força gravitacional ou o meio de diluição deverão ser ajustados (Amann e Pickett, 1987).

Cochran et al. (1984), avaliando dois protocolos de centrifugação (650 G a 37°C em glicose-EDTA e 400 G a 20°C em citrato-EDTA), observaram que o percentual de recuperação espermática não diferiu entre os protocolos e que o percentual de motilidade espermática progressiva foi superior quando o sêmen foi centrifugado a 400 G na temperatura de 20°C, em citrato-EDTA. A utilização de temperaturas inferiores, 20°C ao invés de 37°C, facilitou a sedimentação pela redução da motilidade espermática, o que propiciou uma centrifugação a 400 G.

Para o envase dos espermatozoides, o mais comumente utilizado são palhetas plásticas com capacidade que variam de 0,5 a 5 mL. Quanto menor o diâmetro da palheta, mais uniforme será o congelamento (Jasko, 1994).

Papa e Dell'Aqua Júnior (2001) testaram os mais adequados tipos de envase para o congelamento do sêmen eqüino (macrotubo de 4 mL, palheta de 0,5 mL e mini palheta de 0,25 mL) e temperaturas de descongelamento (38°C, 46°C e 65°C), com base nos parâmetros espermáticos e análises computadorizadas. Esses autores concluíram que as palhetas de 0,5 e 0,25 mL, descongeladas a 65°C, foram mais eficazes na preservação da viabilidade espermática.

Pesquisadores compararam a motilidade espermática pós-descongelamento de espermatozóides resfriados a -60°C/minuto, colocando-se as palhetas de 0,5 mL horizontalmente no vapor de nitrogênio à temperatura de -160°C, ou submetidos a curvas controladas de 10°C/minuto de 20°C a -15°C e, após atingir esse patamar, a queda de temperatura foi de 25°C/minuto. Esses pesquisadores não observaram diferenças na motilidade espermática pós-descongelamento (Cochran et al., 1984; Cristanelli et al., 1985).

As lesões das células espermáticas ocorrem principalmente durante a curva de congelamento, que é influenciada pela altura das palhetas em relação à superfície do nitrogênio líquido (Papa et al., 2003). Esses pesquisadores testaram quatro alturas entre o nível do nitrogênio líquido e o suporte contendo as doses de sêmen, no processo de congelamento: um, três, seis e nove centímetros. A análise estatística revelou não haver diferença nos parâmetros espermáticos pós-descongelamento com o emprego de diferentes alturas de congelamento das palhetas, acima do nível do líquido do nitrogênio, apesar das alturas três e seis centímetros mostrarem resultados com tendência à superioridade às demais, na maioria dos parâmetros aferidos. Segundo Jasko (1994), as palhetas devem ser localizadas aproximadamente três centímetros acima do vapor de nitrogênio e deverão permanecer por, no mínimo, dez minutos, quando utilizadas as palhetas de

0,5 mL e, vinte minutos quando utilizadas as palhetas de 5 mL.

Para o sêmen congelado em macrotubos, o melhor protocolo de descongelamento é a 50°C por quarenta ou quarenta e cinco segundos (Martin et al., 1979). Cochran et al., (1984) compararam o efeito do descongelamento a 37°C por trinta segundos e do descongelamento a 75°C por sete segundos, seguido da imersão a 37°C por um tempo superior a cinco segundos. Em dois experimentos, o percentual de motilidade progressiva foi maior quando o sêmen foi descongelado a 75°C. Embora sete segundos seja um tempo apropriado para o descongelamento em palhetas de 0,5 mL de cloreto de polivinil, um tempo de dez segundos foi necessário para as palhetas de polipropileno. Em ambos os casos, a temperatura deve ser rigidamente controlada, pois existe apenas um segundo de margem de erro antes da temperatura exceder 40°C, o que poderia ser deletério aos índices de prenhez, devido às alterações ou até morte dos espermatozóides. O tipo de palheta utilizada é importante, pois a condução do calor nesses dois tipos é diferente. Esses autores sugerem que após o descongelamento a 75°C por sete ou dez segundos, a palheta deve ser imediatamente transferida para um banho-maria e permanecer nesse por um tempo superior a cinco segundos, com o objetivo de resfriar o interior da palheta e trazer a temperatura interna para 37°C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Garanhões e coleta do sêmen

Foram utilizados nove garanhões da raça Mangalarga Marchador, comprovadamente férteis, pertencentes a uma mesma propriedade, no município de Lagoa Santa, Minas Gerais. Os garanhões eram submetidos ao mesmo manejo nutricional, com idades variando entre quatro e quinze

anos. Esses animais foram submetidos, diariamente, à coleta de sêmen até a estabilização de suas reservas espermáticas extragonadais. Dois dias após o equilíbrio das reservas, iniciou-se o congelamento e, quando houve a necessidade de se repetir o congelamento, os ganhões foram mantidos em regime de coleta de sêmen a cada três dias. Para uso experimental, foi coletado um ejaculado de cada ganhão, utilizando-se vagina artificial de fundo fechado, modelo Hannover, internamente revestida com luva plástica descartável e lubrificada. A temperatura interna da vagina artificial no momento da coleta foi de 42°C. Utilizou-se como manequim, uma égua em cio induzido.

Foram submetidas ao congelamento, apenas as amostras de sêmen dos ganhões que obtiveram motilidade espermática progressiva superior a 60% após a diluição inicial, patologia espermática inferior a 30% e número total de espermatozoides por ejaculado superior a três bilhões. Essa avaliação foi realizada após a estabilização das reservas extragonadais dos animais.

3.2 Avaliação seminal e espermática

Após a coleta retirou-se a fração gel do ejaculado, com o auxílio de uma seringa de 20 mL. Posteriormente, o sêmen foi filtrado por meio de filtros descartáveis.

Avaliou-se, macroscopicamente, a fração do ejaculado, livre de gel, *in natura*, quanto ao volume, cor, odor e aspecto. A concentração espermática foi avaliada por meio da câmara de Neubauer, em amostra diluída 1:100 em formol salina tamponada. A avaliação microscópica consistiu na determinação da motilidade espermática total e progressiva, vigor do movimento espermático, integridade funcional da membrana plasmática por meio do teste hiposmótico, e avaliação da integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal por meio de sondas fluorescentes. Os primeiros parâmetros foram avaliados pré e pós-

descongelamento, enquanto que a integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal foi avaliada somente após o descongelamento.

3.3 Processamento do sêmen para o congelamento

Imediatamente após a retirada da amostra para a determinação da concentração e análise da morfologia espermática, o sêmen foi diluído em igual volume (1:1), em meio diluidor INRA (INRA, 1982) (Tab. 1), pré-aquecido a 37°C. Para a centrifugação, a 400 G por doze minutos, o sêmen foi dividido em quatro a seis alíquotas, dependendo do volume, distribuídos em tubos de centrífuga de 15 mL, e organizados nesta de forma ajustada. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante de cada tubo, deixando-se um volume de plasma seminal igual ao do “pellet” obtido. A ressuspensão foi realizada na proporção de 1:1 no meio diluidor D1 (INRA 82 + 2% de gema de ovo centrifugada). A diluição final foi realizada para obter-se uma concentração de 100×10^6 espermatozoides totais/mL. O volume da dimetilformamida foi calculado de modo que o volume final apresentasse 5% da mesma.

O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, e as mesmas foram seladas com massa de modelar atóxica e colorida, utilizando-se uma cor para representar cada tratamento. O resfriamento controlado prévio foi realizado para alguns tratamentos, sendo realizado na velocidade de -0,25°C/minuto da temperatura ambiente até 5°C, por meio de um congelador de sêmen programável¹. O congelamento foi realizado no vapor de nitrogênio, três centímetros acima do nível do mesmo, por dez minutos, em uma caixa de isopor com as seguintes proporções: 18,6 cm de altura, 32,5 cm de largura e 32,5 cm de comprimento. Posteriormente, as palhetas foram submergidas no nitrogênio líquido. A

¹ TK-2000 – Tetakon - Nutricell

temperatura ambiente durante o processo de congelamento foi, em média, de 20°C.

As amostras de sêmen foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido por, no mínimo, sete dias, antes de se proceder sua avaliação. O sêmen foi descongelado a 52°C por dez segundos, seguido da imersão em banho-maria a 37°C por trinta segundos (Juliani et al., 2003).

Tabela 1. Composição do diluidor básico utilizado no INRA 82 com 20mMoles Hepes e dos diluidores derivados D1 e D2

Componente	1 litro
Glicose anidra	25g
Lactose 1 H ₂ O	1,5g
Rafinose 5 H ₂ O	1,5g
Citrato de Sódio 2 H ₂ O	0,25g
Citrato de potássio 1 H ₂ O	0,41g
Hepes	4,76g
Água Milli Q autoclavada	qsp 0,5 litro
Leite desnatado UHT	0,5 litro
Sulfato de gentamicina	50mg
Penicilina G potássica	50.000UI
pH	6,8
mOsmol/kg	303

Fonte: Magistrini et al. (1992).

Diluidores derivados:

D1= INRA 82 + 2% de gema de ovo centrifugada

D2= INRA 82 + 2% de gema de ovo centrifugada + 5% de dimetilformamida

Para o preparo da gema de ovo centrifugada, foram utilizados 40 mL do meio diluidor INRA 82, misturados com 50 mL de gema de ovo *in natura* (ovo de um dia) durante dez minutos. Depois, foram colocados os 90 mL em dois tubos de 50 mL (45 mL em cada um) e centrifugados a 600 G por dez minutos. Aspirou-se o sobrenadante, deixando-se 5 mL no fundo de cada tubo; 80 mL do sobrenadante foram adicionados a 1,92 litros do meio INRA para produzir dois litros de D1.

3.4 Tratamentos em teste

Foram testadas duas formas de adição do meio diluidor final (INRA 82 modificado + 2% de gema de ovo + quantidade necessária de dimetilformamida para que o volume final tenha 5%) ao meio diluidor base, em única ou múltiplas etapas, e duas curvas de congelamento, com ou sem resfriamento controlado prévio. Os tratamentos em teste foram: **tratamento 1.** adição do meio diluidor final ao meio base, em única etapa, à temperatura ambiente, seguido pelo congelamento sem resfriamento controlado prévio (controle); **tratamento 2.** adição do meio diluidor final ao meio base, em múltiplas etapas, à temperatura ambiente, seguido pelo congelamento sem resfriamento controlado prévio; **tratamento 3.** adição do meio diluidor final ao meio base, em única etapa, à temperatura ambiente, seguido de uma curva de resfriamento pré-congelamento na velocidade de -0,25°C/minuto da temperatura ambiente até 5°C, utilizando-se para isso um congelador de sêmen programável; **tratamento 4.** adição do meio diluidor final ao meio base, em múltiplas etapas, à temperatura ambiente, seguido de uma curva de resfriamento pré-congelamento na velocidade de -0,25°C/minuto da temperatura ambiente até 5°C, utilizando-se para isso um congelador de sêmen programável¹. O tempo máximo do início do resfriamento ao início do congelamento foi padronizado em uma hora e quarenta e cinco minutos. A adição gradativa do meio diluidor final foi realizada pela introdução de um décimo do volume total a ser adicionado por minuto. No décimo minuto, a adição do meio diluidor final ao meio base, em única etapa, foi realizada. A osmolaridade do meio diluidor base foi de 317,5 mOsmol/Kg e do meio base adicionado de 5% de dimetilformamida foi de 1063 mOsmol/Kg.

3.5 Métodos de avaliação espermática

3.5.1 Motilidade e vigor

As motilidades espermáticas total e progressiva e o vigor do movimento espermático foram analisados por três técnicos capacitados, utilizando-se microscopia óptica² com aumento de 400X. Uma alíquota de 10 µL (microlitros) de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C. As motilidades espermática total e progressiva foram expressas em porcentagem de células móveis, sendo considerados como progressivos o movimento retilíneo e o circular aberto. O vigor do movimento espermático foi classificado na escala de zero (ausente) a cinco (vigor máximo).

3.5.2 Morfologia espermática

A morfologia espermática foi avaliada em amostras de sêmen preservadas em solução de formol salina tamponada (Hancock, 1957), utilizando-se preparações úmidas entre lâmina e lamínula, com o auxílio de um microscópio de contraste de fase² no aumento de 1000X, sendo avaliadas cem células por amostra.

As alterações nas formas dos espermatozoides foram agrupadas de acordo com sua localização: defeitos de cabeça, peça intermediária e peça principal/peça terminal. As presenças de gotas citoplasmáticas proximais e distais, foram computadas separadamente. Cada célula espermática foi classificada em apenas uma categoria de defeitos. As células que apresentaram mais de um defeito espermático, quando esses compreenderam defeitos de peça intermediária, peça principal e peça terminal, importantes para os cálculos do teste hiposmótico, foram computadas nesses defeitos. As células que apresentaram mais de um defeito, não compreendendo os acima citados, foram computadas nas alterações mais próximas ao ápice do espermatozoide.

²Microscópio Olympus CBA

3.5.3 Teste de termo-resistência

Imediatamente após o descongelamento, o sêmen foi avaliado quanto à motilidade espermática total e progressiva e vigor do movimento espermático e, posteriormente, incubados em banho-maria a 37°C por até trezentos e trinta minutos. O sêmen foi avaliado a cada trinta minutos, até que a motilidade espermática progressiva fosse inferior a 10%.

3.5.4 Avaliação da integridade funcional da membrana plasmática da cauda do espermatozoide por meio do teste hiposmótico (HO)

O teste hiposmótico foi realizado seguindo a metodologia descrita por Melo e Henry (1999). Amostra de 50 µL (microlitros) de sêmen foi diluída em 500 µL (microlitros) de solução de sacarose a 100 mOsmol/Kg (Tab. 2), ambos a 37°C, seguido de incubação em banho-maria a 37°C por trinta minutos. Em seguida, as amostras foram fixadas em 250 µL (microlitros) de solução de formol salina tamponada para posterior análise.

O teste hiposmótico foi realizado em diferentes momentos: após a adição do meio diluidor final ao meio base, em única ou múltiplas etapas, imediatamente após o descongelamento e após trinta e sessenta minutos de incubação, em banho-maria a 37°C, durante o teste de termo-resistência, pós-descongelamento.

A avaliação do teste hiposmótico (HO) foi realizada em microscopia de contraste de fase² com aumento de 400X, sendo contadas cem células por amostra. A porcentagem de formas reativas ao HO foi calculada por meio da fórmula segundo Melo e Henry (1999):

$HO (\%) = (\% \text{ de alterações na região da cauda após o teste HO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste HO})$.

A Fig. 1 exemplifica espermatozoides com e sem reação ao teste hiposmótico (HO)

Tabela 2. Preparo da solução de sacarose a 100 mOsmol/L (solução hiposmótica)

Sacarose a 300 mOsmol/Kg	
Sacarose	10,7 g
Água destilada autoclavada qsp	100 ml

<i>Sacarose a 100 mOsmol/Kg</i>	
Diluir 1 parte de sacarose a 300 mOsmol/Kg : 2 partes de água destilada	

Fonte : Melo e Henry (1999).

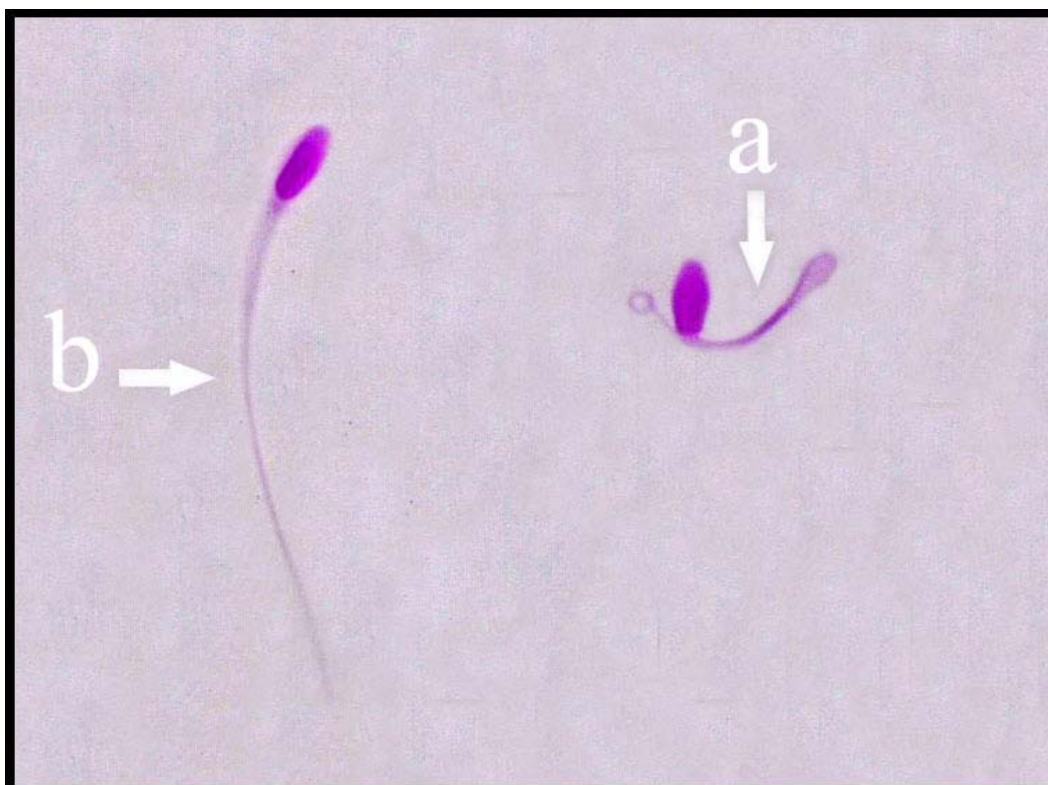


Figura 1. **a** = alteração morfológica da cauda do espermatozói­de eqüino que pode caracterizar a reação hiposmótica; **b** = espermatozói­de sem reação ao teste hiposmótico. Material fixado em formol-salina e corados pela técnica do Rosa de bengala. Aumento de 1071X.

3.5.5 Avaliação da integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal por meio de sondas fluorescentes

Foram utilizados dois substratos fluorogênicos, o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídeo (IP), seguindo o protocolo proposto por Harrison e Vickers (1990) e modificado por Zúccari (1998).

As soluções de CFDA e IP foram preparadas e armazenadas ao abrigo da luz e estocadas congeladas a -20°C em palhetas de 0,25 mL. As soluções de formol e citrato de sódio foram preparadas e estocadas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente.

Preparou-se a solução trabalho, conforme discriminado na Tab. 3, no dia do descongelamento do sêmen, ao abrigo da luz. Após preparada, a solução trabalho era então fracionada, colocando-se 40 µL

(microlitros) dessa solução por frasco de armazenamento. Após o descongelamento das palhetas, 10 µL (microlitros) de sêmen foram adicionados a cada frasco contendo os 40 µL (microlitros) da solução trabalho. As amostras foram incubadas à temperatura de 37°C por oito minutos e avaliadas imediatamente ao abrigo da luz. Foram avaliadas duzentas células por amostra. O preparo dos fluorocromos está discriminado na Tab. 3.

Para a interpretação dos resultados foram consideradas três categorias de células de

acordo com a fluorescência apresentada pelos espermatozoides: íntegros-espermatozoides verdes fluorescentes em toda a sua extensão, células coradas pelo CFDA; lesados-espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal lesadas, células coradas pelo IP, apresentando-se vermelhas; semi-lesados- o núcleo corou-se de vermelho pelo IP, mas alguma fluorescência verde (CFDA) foi observada no acrossoma e na região da peça intermediária.

Tabela 3. Composição das soluções estoque e de trabalho empregadas na técnica de fluorescência para a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal dos espermatozoides

Soluções	Constituintes	Quantidade
I. Solução Estoque de CFDA	CFDA DMSO	2,3mg 5mL
II. Solução Estoque de IP	IP 0,9% NaCl	2mg 4mL
III. Solução Estoque de Formalina 40%	Formol a 40% 0,9% NaCl	Diluição 1:80 100µL de formol a 40% 7,9mL de solução fisiológica
IV. Solução Estoque de citrato de Sódio	Citrato de sódio 0,9% NaCl	3g 100mL
V. Solução Trabalho	CFDA IP Formol Citrato de sódio	20µL 10µL 10µL 960µL
Amostras para avaliação	Sêmen Solução Trabalho	10µL 40µL

Fonte: Zúcarri (1998) CFDA - diacetato de carboxifluoresceína ; IP - iodeto de propídeo ; DMSO - dimetil-sulfóxido; NaCl - cloreto de sódio.

3.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, considerando-se o ganhão como bloco em arranjo em parcela subdividida, sendo a forma de adição do diluidor a parcela e o resfriamento a subparcela. Para a análise do teste hiposmótico imediatamente

após o dscongelamento e trinta e sessenta minutos durante o teste de termo-resistência pós-descongelamento, o delineamento experimental foi em blocos ao acaso, considerando-se o ganhão como bloco em arranjo em parcela sub-subdividida, sendo considerada a forma de adição do diluidor a parcela, o resfriamento a subparcela e o

tempo de incubação a sub-subparcela. Os cálculos de média, desvio padrão e análise de variância foram calculados conforme Sampaio (1998).

Os efeitos das formas de adição do crioprotetor ao meio base e das curvas de congelamento foram avaliados pela análise de variância e as médias obtidas para os diferentes parâmetros avaliados (motilidade total, motilidade progressiva, integridade funcional da membrana plasmática e integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides) foram comparadas pelo teste de Duncan ao 5% de significância. O percentual de semi-lesados, na análise da integridade estrutural dos espermatozoides, apresentou valores percentuais com grande amplitude de variação e foi transformada utilizando-se a raiz quadrada de semi.

A variável vigor foi comparada por meio do teste de Kruskal-Wallis. O teste de Lilliefors foi aplicado para a verificação de

normalidade e os testes de Cochran e Bartlett foram aplicados para a verificação da homogeneidade das variâncias. As correlações existentes entre as variáveis foram calculadas pelo método de Pearson.

O vigor espermático após a adição do D2 ao meio base nas duas formas em teste pré-congelamento foi calculado pelo método de Wilcoxon. A variável motilidade espermática progressiva, no teste de termo-resistência, foi comparada por meio do teste de Kruskal-Wallis. As Tab. A.1, A.2, A.3, A.4, A.5, A.6 e A.7, referentes às análises de variância dos parâmetros avaliados, estão discriminados em anexo. Na análise estatística foi utilizado o programa SAEG, versão 8.0 (UFV).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características físicas do sêmen, avaliadas imediatamente após a diluição inicial estão discriminadas na Tab. 4.

Tabela 4. Características físicas do sêmen, *in natura*, de nove garanhões da raça Mangalarga Marchador

SPTZ	Garanhões										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	X	S
MT(%)	95,0	90,0	75,0	75,0	87,5	80,0	91,3	70,0	85,0	83,2	8,6
MP(%)	90,0	83,3	68,3	68,3	82,5	70,0	83,8	61,7	75,0	75,9	9,4
Vigor	4,5	4,3	3,5	3,5	3,7	4,0	4,3	2,0	3,5	3,8	0,5

SPTZ – espermatozoides, MT- motilidade total, MP- motilidade progressiva, X - média dos nove garanhões, s - desvio padrão.

As motilidades espermáticas total e progressiva, o vigor do movimento espermático e a integridade funcional da membrana plasmática, avaliados

imediatamente após a adição do crioprotetor dimetilformamida ao meio base, em única ou múltiplas etapas, estão discriminadas na Tab. 5.

Tabela 5. Parâmetros espermáticos, pré-congelamento, de nove garanhões, avaliados imediatamente após a adição do crioprotetor dimetilformamida ao meio base, em única ou múltiplas etapas

	MT (%)	MP (%)	Vigor (0-5)	HO (%)
Única etapa	80,7 ± 6,0	72,9 ± 7,0	3,4 ± 0,3	55,3 ± 15,4
Múltiplas etapas	77,1 ± 17,8	70,0 ± 16,2	3,3 ± 0,8	52,0 ± 16,6

MT - motilidade total, MP - motilidade progressiva, HO - porcentagem de espermatozoides com membranas funcionalmente íntegras. Média de nove garanhões, (p>0,05).

No presente estudo, não foram observadas diferenças no percentual de motilidade espermática total, progressiva, vigor do movimento espermático e porcentagem de espermatozoides com membranas funcionalmente íntegras, entre as duas formas de adição do crioprotetor ao meio base, antes dos espermatozoides serem submetidos ao processo de congelamento.

Barry e Anthony (2001), testaram os efeitos da adição e remoção do glicerol na motilidade, potencial de membrana mitocondrial, viabilidade e integridade acrossomal dos espermatozoides eqüinos e observaram que a adição de concentrações crescentes do crioprotetor intracelular, glicerol, ocasionou uma queda na motilidade espermática eqüina. Quando os espermatozoides equilibrados com o glicerol foram abruptamente submetidos a condições próximas a isosmóticas, houve uma redução significativa na motilidade espermática para todas as concentrações de glicerol testadas (325, 600, 900, 1200, 1500 e 1800 mOsm) ($p < 0.0001$). A motilidade não diferiu entre cinco e dez minutos seguidos do reequilíbrio dos espermatozoides em condições isosmóticas. O potencial de membrana mitocondrial não foi significativamente alterado pelo aumento na osmolaridade associado com o aumento na concentração de glicerol. Todavia, quando os espermatozoides foram abruptamente retornados a condições isosmóticas, houve um declínio significativo no potencial de

membrana mitocondrial ($p < 0.0001$). Esses pesquisadores avaliaram também os efeitos da adição e remoção de concentrações de 1.0 M de crioprotetores intracelulares: glicerol, dimetilsulfóxido, etilenoglicol e propilenoglicol na motilidade, viabilidade e integridade acrossomal da célula espermática eqüina e observaram que a adição ou remoção de todos os crioprotetores reduziu a motilidade total comparada com o grupo controle ($p < 0.05$). Dentre os crioprotetores testados, a remoção abrupta do glicerol, após o retorno das células a condições isosmóticas, resultou no maior decréscimo na motilidade total e progressiva ($p < 0.01$). Em contraste, a remoção abrupta do etilenoglicol resultou no menor declínio na motilidade espermática total e progressiva ($p < 0.01$), dentre todos os crioprotetores testados.

Provavelmente, no presente estudo, a adição brusca da dimetilformamida, um crioprotetor de baixo peso molecular, à temperatura ambiente, não foi suficiente para produzir uma diferença nas motilidades espermáticas total e progressiva e integridade funcional da membrana plasmática, quando comparadas à adição em múltiplas etapas, antes dos espermatozoides serem submetidos ao congelamento.

Os parâmetros espermáticos, de espermatozoides eqüinos, congelados por vários protocolos, estão apresentados nas Tab. 6, 7 e 8.

Tabela 6. Porcentagem de motilidades espermáticas total e progressiva pós-descongelamento de espermatozoides eqüinos congelados por vários protocolos

Adição do crioprotetor	Motilidade Total		Motilidade Progressiva	
	Sem resfriamento	Com resfriamento	Sem resfriamento	Com resfriamento
Única etapa	42,3±14,0 ^{bb} (T1)	55,4±8,0 ^{ba} (T3)	35,8±12,9 ^{bb} (T1)	49,3±7,8 ^{ba} (T3)
Múltiplas etapas	52,5±18,4 ^{ab} (T2)	63,6±14,3 ^{aa} (T4)	46,5±18,1 ^{ab} (T2)	58,2±14,0 ^{aa} (T4)

^{a,b} médias com diferentes sobrescritos, para um mesmo parâmetro, dentro da coluna são diferentes ($P < 0,05$); ^{A,B} médias com diferentes sobrescritos, para um mesmo parâmetro, dentro da linha, são diferentes ($P < 0,05$). Média de nove garanhões.

Tabela 7. Vigor espermático pós-descongelamento de espermatozoides equinos congelados por várias técnicas

Adição do crioprotetor	Vigor do movimento espermático pós-descongelamento	
	Sem resfriamento	Com resfriamento
Única etapa	2,7 ± 0,4 ^{aA} (T1)	2,9 ± 0,2 ^{aA} (T3)
Múltiplas etapas	3,0 ± 0,6 ^{aA} (T2)	2,9 ± 0,8 ^{aA} (T4)

^a letras minúsculas foram utilizadas para as comparações na mesma coluna; ^A letras maiúsculas foram utilizadas para as comparações na mesma linha (P>0,05). Média de nove gananhões.

Tabela 8. Porcentagem de células espermáticas com integridade funcional da membrana plasmática (HO) pós-descongelamento imediatamente após o descongelamento, 30 e 60 minutos de TTR, submetidas a diferentes protocolos de congelamento

Tempo	Adição do crioprotetor	Hiposmótico do sêmen <i>in natura</i> = 51,2 ± 12,3	
		Sem resfriamento	Com resfriamento
0	Única etapa	14,7 ± 12 ^{bB1} (T1)	24,6 ± 7,5 ^{bA1} (T3)
	Múltiplas etapas	18,8 ± 8,1 ^{aB1} (T2)	31,7 ± 11,8 ^{aA1} (T4)
30	Única etapa	10,7 ± 11,4 ^{bB2} (T1)	21 ± 7,1 ^{bA2} (T3)
	Múltiplas etapas	14,7 ± 9,8 ^{aB2} (T2)	27,1 ± 10,7 ^{aA2} (T4)
60	Única etapa	6,8 ± 8,6 ^{bB3} (T1)	15,8 ± 6,7 ^{bA3} (T3)
	Múltiplas etapas	11,6 ± 9,6 ^{aB3} (T2)	19,8 ± 8,4 ^{aA3} (T4)

^{a,b} médias com diferentes sobrescritos são diferentes (P< 0,05) dentro da coluna; ^{A,B} médias com diferentes sobrescritos são diferentes (P< 0,05) dentro da linha; ^{1,2,3} médias com diferentes sobrescritos, para uma mesma condição, são diferentes, dentro da coluna. Média de nove gananhões.

Os resultados obtidos após o descongelamento demonstram que a adição do crioprotetor em múltiplas etapas foi mais eficaz em preservar a motilidade espermática total e progressiva e a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides quando comparada à adição em única etapa, independentemente da curva de congelamento adotada (p<0,05), (Tab. 6 e 8). Independentemente da forma de adição do crioprotetor, a curva de congelamento com resfriamento controlado prévio, na velocidade de -0,25°C/minuto da temperatura ambiente até 5°C, preservou melhor a motilidade espermática total e progressiva e a integridade funcional da membrana plasmática (p<0,05), demonstrando que não houve interação entre a forma de adição do crioprotetor e a curva de congelamento adotada (p<0,05), (Tab. 6). O vigor do movimento espermático após o descongelamento foi preservado de maneira

similar pelas duas formas de adição do crioprotetor ao meio base (p>0,05), (Tab. 7). Esses resultados indicam que as injúrias decorrentes do estresse osmótico e térmico são agravadas durante as etapas de resfriamento e de congelamento dos espermatozoides.

Os resultados obtidos no teste hiposmótico, realizado imediatamente após o descongelamento e aos trinta e sessenta minutos durante o teste de termo-resistência pós-descongelamento, demonstram que, independentemente da curva de congelamento adotada, a adição do crioprotetor ao meio base, em múltiplas etapas, foi mais eficiente em preservar a integridade funcional da membrana plasmática, quando comparada à adição em uma única etapa (p<0,05), (Tab. 8). A superioridade da adição do crioprotetor ao meio base, em múltiplas etapas, prevaleceu em todos os tempos testados.

Os espermatozoides que foram submetidos ao resfriamento pré-congelamento, independentemente da forma de adição do crioprotetor ao meio base, preservaram melhor a integridade funcional de suas membranas plasmáticas imediatamente após o descongelamento e trinta e sessenta minutos após o descongelamento (Tab. 8) e

tiveram sua motilidade espermática progressiva melhor preservada ($p < 0,05$), conforme demonstrado na Fig. 2. Foi observada queda ($p < 0,05$) nos valores percentuais de células com a integridade funcional de suas membranas plasmáticas preservadas entre os tempos testados ($p < 0,05$, Tab. 8).

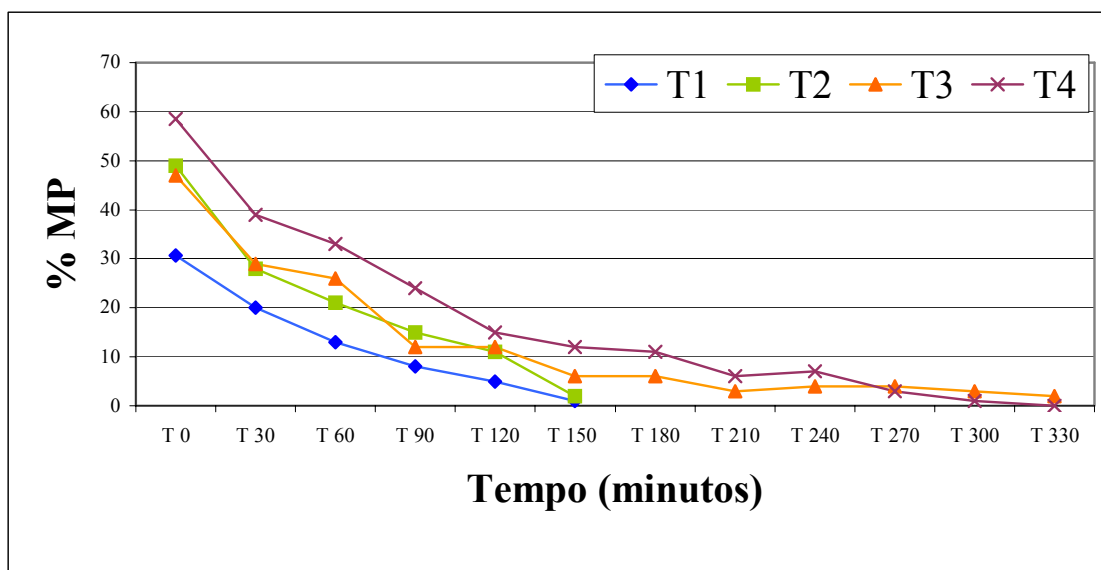


Figura 2. Médias da motilidade espermática progressiva de espermatozoides de cinco garanhões congelados por quatro protocolos e submetidos ao teste de termo resistência pós-descongelamento. T1 – Adição do crioprotetor, em uma única etapa, sem resfriamento prévio, T2 – Adição do crioprotetor, em múltiplas etapas, sem resfriamento prévio, T3 – Adição do crioprotetor, em uma única etapa, com resfriamento prévio, T4 – Adição crioprotetor, em múltiplas etapas, com resfriamento prévio. Média de cinco garanhões.

Foi observada superioridade da adição do crioprotetor em múltiplas etapas em relação à adição em única etapa ($P=0,056$), independentemente da curva de congelamento adotada. A curva de congelamento, com resfriamento prévio, preservou mais eficientemente a motilidade espermática progressiva dos espermatozoides, quando comparada à curva de congelamento, sem resfriamento prévio ($p < 0,05$), independentemente da forma de adição do crioprotetor ao meio base.

Dentre os quatro tratamentos em teste, o protocolo de congelamento, que adotou a adição do crioprotetor em múltiplas etapas e

uma curva de congelamento com resfriamento controlado prévio (T4), foi o mais eficaz na preservação da longevidade espermática ($p < 0,05$), sendo significativa a queda da motilidade espermática progressiva somente a partir dos 210 minutos de incubação do sêmen, em banho-maria, a 37°C . O protocolo de congelamento que também adotou a curva de congelamento com resfriamento controlado prévio, porém com adição do crioprotetor em única etapa (T3), apresentou queda na motilidade espermática progressiva a partir dos 180 minutos de incubação ($p < 0,05$). A motilidade espermática progressiva apresentou queda significativa a partir dos

180 minutos de incubação ($p < 0,05$) quando a adição do crioprotetor ao meio base foi realizada em múltiplas etapas, e não houve resfriamento prévio (T2) e a partir dos 150 minutos de incubação ($p < 0,05$), quando a mesma curva foi adotada e a adição do crioprotetor ao meio base foi efetuada em única etapa (T1). A Tab. A.1. (anexos) discrimina as médias, os desvios e os erros padrões das características seminais nos quatro tratamentos em teste, durante o teste de termo-resistência.

As motilidades espermáticas total e progressiva, após a diluição inicial, variaram de 70 a 95% e de 61,7 a 90%, com médias de 83,2% e 75,9%, respectivamente (Tab. 4). As motilidades espermáticas total e progressiva após o descongelamento variaram de 28,3 a 77,9 % e de 22,9 a 72,2%, respectivamente, dependendo do tratamento ao qual o sêmen foi submetido. Foi observada grande variabilidade para as motilidades total e progressiva entre ganhões e tratamentos para um mesmo ganhão (Fig. 3). Variações entre ganhões e entre tratamentos para um mesmo ganhão já foram descritas por outros pesquisadores (Cottorello, 2002; Snoeck, 2003).

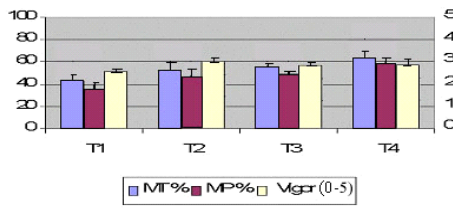
Nas análises dos gráficos dos ganhões observa-se grande variabilidade entre ganhões e entre tratamentos para um mesmo ganhão. Para os ganhões um, sete e oito foi observada pouca variação entre os tratamentos, enquanto que para os ganhões dois, três e nove os tratamentos dois e quatro foram mais eficientes na preservação da motilidade espermática total

e progressiva após o descongelamento, indicando que para os ganhões dois, três e nove, a redução do estresse osmótico foi mais importante na preservação da viabilidade espermática do que a redução do estresse térmico, uma vez que nos tratamentos dois e quatro, a adição do crioprotetor foi realizada em múltiplas etapas e o tratamento dois adotou uma curva de congelamento sem resfriamento prévio.

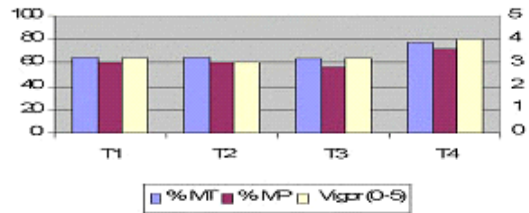
Para os ganhões quatro e seis, os tratamentos três e quatro foram mais eficientes na preservação da motilidade espermática total e progressiva após o descongelamento, indicando ser a redução do estresse térmico mais importante na preservação da viabilidade espermática, uma vez que nos tratamentos três e quatro a curva de congelamento foi realizada com resfriamento prévio e no tratamento três, a adição do crioprotetor ao meio base foi realizada em única etapa. Esses resultados indicam haver interação entre tratamentos e ganhões. Na média dos nove ganhões o tratamento quatro, que associou a adição do crioprotetor ao meio base em múltiplas etapas à uma curva de congelamento com resfriamento controlado prévio foi o mais eficiente na preservação da motilidade espermática total e progressiva dentre os quatro tratamentos testados.

Os resultados da avaliação da integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal por meio das sondas fluorescentes, diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo, estão discriminados na Tab. 9.

Médias - % MT, % MP, Vigor (0-5)

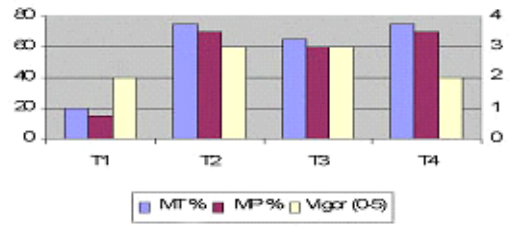


Garanhão 01



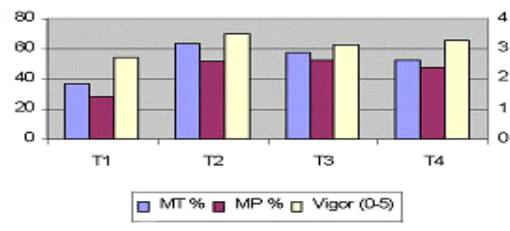
Garanhão 02

Garanhão 03



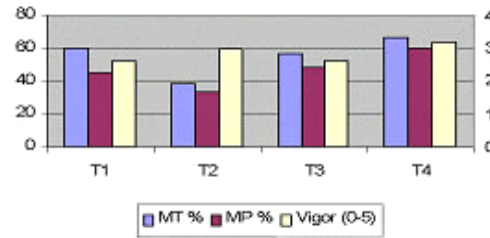
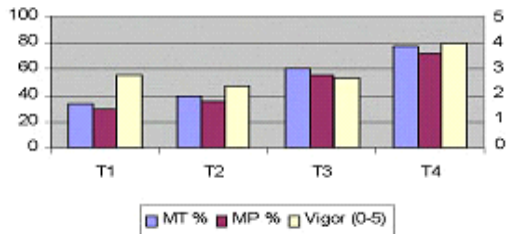
Garanhão 04

Garanhão 05



Garanhão 06

Garanhão 07



Garanhão 08

Garanhão 09

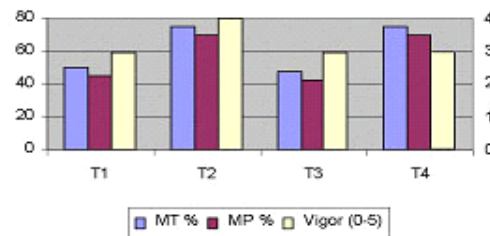
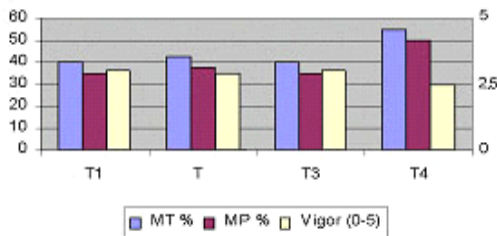


Figura 3. Motilidade espermática total e progressiva e vigor do movimento espermático de equinos submetidos a quatro protocolos de congelamento. Média de nove garanhões e comportamento individual dos mesmos. T1- Adição do crioprotetor, em única etapa, sem resfriamento prévio; T2- Adição do crioprotetor, em múltiplas etapas, sem resfriamento prévio; T3- Adição do crioprotetor, em única etapa, com resfriamento prévio; T4- Adição do crioprotetor, em múltiplas etapas, com resfriamento prévio.

Tabela 9. Porcentagem média de espermatozóides eqüinos com integridade das membranas plasmática e acrossomal submetidos a quatro técnicas de congelamento

Adição do crioprotetor	Íntegros		Semi-lesados		Lesados	
	Sem resfriamento	Com resfriamento	Sem resfriamento	Com resfriamento	Sem resfriamento	Com Resfriamento
Única etapa	35,6±14,4 ^{aA} (T1)	36,0±8,6 ^{aA} (T3)	4,0±2,5 ^{aA} (T1)	20,8±11,2 ^{aA} (T3)	60,3±15,4 ^{aA} (T1)	43,2±11,4 ^{aB} (T3)
Múltiplas etapas	37,8±11,2 ^{aA} (T2)	45,2±13,6 ^{aA} (T4)	4,2±4,3 ^{aA} (T2)	23,0±10,5 ^{aA} (T4)	58,0±14,5 ^{ba} (T2)	31,8±9,3 ^{bb} (T4)

^{ab} médias com diferentes sobrescritos para um mesmo parâmetro são diferentes (P < 0,05) dentro da coluna; ^{AB} médias com diferentes sobrescritos para um mesmo parâmetro são diferentes (P < 0,05) dentro da linha; Média de nove ganhões.

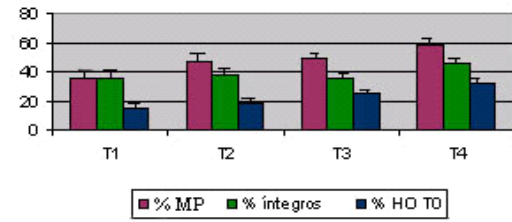
Os resultados demonstram que a adição em única etapa foi mais lesiva para as membranas plasmáticas e acrossomais, independentemente da curva de congelamento adotada (Tab. 9). A curva de congelamento, sem resfriamento prévio, foi menos eficaz na preservação das integridades estruturais das membranas plasmática e acrossomal, independentemente da forma de adição do crioprotetor adotada. A porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra e plasmática lesada não diferiu entre os tratamentos (p>0,05). A porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras não diferiu entre os tratamentos (p>0,05). A Fig. 4 apresenta os resultados obtidos.

Na análise da Fig. 4, os resultados obtidos demonstram maior percentual de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras, quando comparada ao percentual de células reativas ao teste hiposmótico imediatamente após o descongelamento, reforçando a hipótese de que os

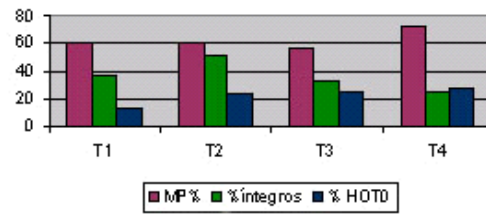
espermatozóides possuem regiões da membrana com diferentes graus de resistência aos processos de congelamento e descongelamento, sendo a membrana da cauda dos espermatozóides mais sensível a esse processo.

Os ganhões quatro, cinco, seis e sete congelam melhor com resfriamento prévio, enquanto que os ganhões um, dois, três e oito congelam melhor quando a adição do crioprotetor se dá em múltiplas etapas. Isso indica que houve interação entre ganhão e tratamento. Na análise do gráfico representativo das médias de todos os ganhões, observa-se que o tratamento que associou uma curva de congelamento com resfriamento prévio à adição do crioprotetor em múltiplas etapas preservou melhor a motilidade espermática progressiva, a integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal, assim como a integridade funcional da membrana plasmática.

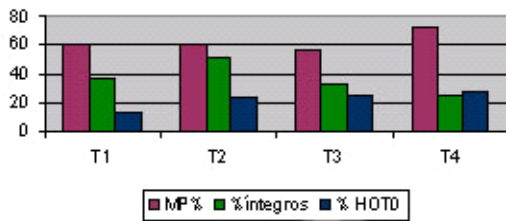
Médias % MP, % Íntegros, % HOTO



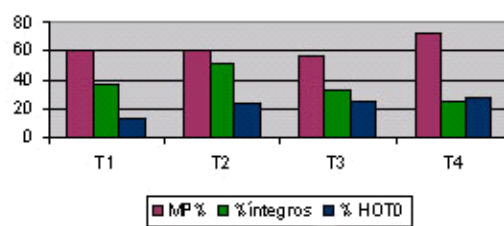
Garanhão 01



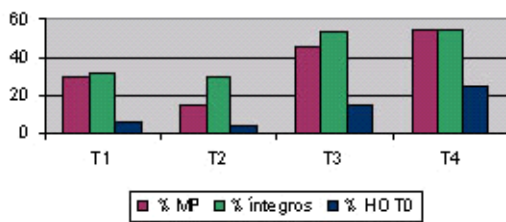
Garanhão 02



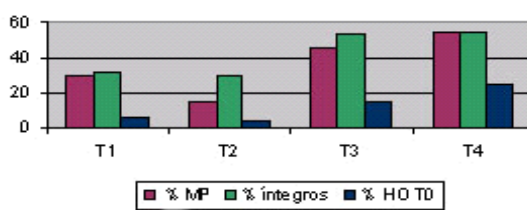
Garanhão 03



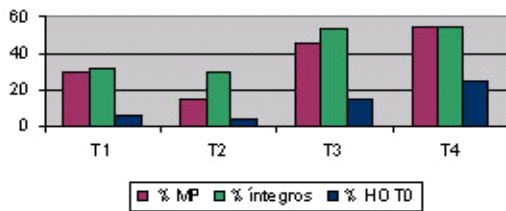
Garanhão 04



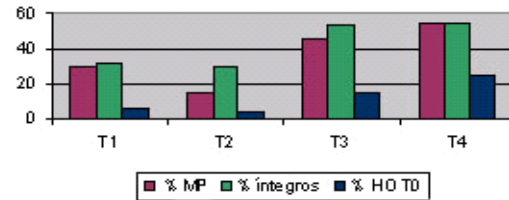
Garanhão 05



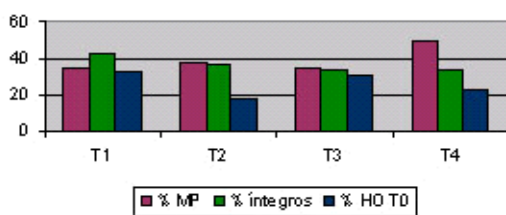
Garanhão 06



Garanhão 07



Garanhão 08



Garanhão 09

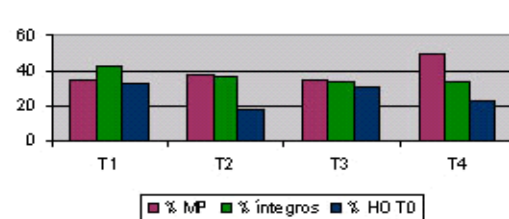


Figura 4. Motilidade progressiva, percentual de células com membranas estruturalmente íntegras e percentual de células com membrana plasmática funcionalmente íntegras no tempo 0 após o descongelamento de espermatozoides equinos submetidos a quatro protocolos de congelamento. Média de nove garanhões e comportamento individual dos mesmos. T1- Adição do crioprotetor em uma única etapa sem resfriamento prévio; T2- Adição do crioprotetor em múltiplas etapas sem resfriamento prévio; T3- Adição do crioprotetor em única etapa com resfriamento prévio; T4- Adição do crioprotetor em múltiplas etapas com resfriamento prévio.

Os coeficientes de correlação entre as variáveis motilidade espermática progressiva, porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática funcional e porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras, avaliados imediatamente após o descongelamento, estão discriminados na Tab. 10. Correlações positivas e de baixa magnitude foram observadas entre motilidade espermática progressiva e porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico, entre motilidade espermática progressiva e membranas plasmática e acrossomal íntegras, entre células com membrana plasmática funcionalmente íntegras e porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomal íntegras, entre motilidade espermática progressiva e porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (semi-lesados) e entre porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico e porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossomal lesada (semi-lesados). Correlações negativas e de baixa magnitude foram observadas entre

motilidade espermática progressiva e porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal lesadas e entre porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico e porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal lesadas (Tab. 10).

Observa-se que a correlação positiva existente entre os parâmetros de motilidade espermática progressiva e porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras e com porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossomal íntegra (semi-lesados) foram similares e ambas menores quando comparadas à correlação negativa observada entre motilidade espermática progressiva e porcentagem de espermatozoides lesados e entre porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico e porcentagem de espermatozoides lesados. Provavelmente, a motilidade espermática progressiva estaria mais intimamente correlacionada à integridade estrutural da membrana acrossomal do que à integridade estrutural da membrana plasmática.

Tabela 10. Correlações simples de Pearson entre os parâmetros espermáticos de ganhões da raça Mangalarga Marchador avaliados imediatamente após o descongelamento

	MP (%)	HO (%)	Íntegros (%)	Semi-lesados (%)	Lesados (%)
MP (%)		0,4934	0,3578	0,3736	- 0,5183
		p = (0,0011)	p = (0,0161)	p = (0,0124)	p = (0,0006)
HO (%)			0,3207	0,5182	- 0,5937
			p = (0,0283)	p = (0,0006)	p = (0,0001)

MP- motilidade espermática progressiva; HO- teste hiposmótico.

Neste estudo, a porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva após o descongelamento foi em média, superior à porcentagem de espermatozoides estruturalmente íntegros e à porcentagem de células reativas ao teste hiposmótico (Tab. 6, 8 e 9 e Fig. 3), indicando que uma grande população de espermatozoides com membranas estruturalmente lesadas e funcionalmente inativas apresentavam-se

progressivamente móvel imediatamente após o descongelamento. Provavelmente, esses espermatozoides foram os primeiros a perder sua motilidade progressiva durante a realização do teste de termo-resistência.

A adição do crioprotetor dimetilformamida ao meio base, em múltiplas etapas, foi mais eficiente na preservação da motilidade espermática total e progressiva; integridade

funcional da membrana plasmática, em todos os tempos testados, menos lesiva à integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal, além de preservar por mais tempo a motilidade espermática progressiva, durante o teste de termo-resistência, quando comparada à adição do crioprotetor em única etapa.

A importância do estresse osmótico na criopreservação espermática tem sido estudada por diversos pesquisadores. Gao et al. (1995) afirmaram que a adição dos agentes crioprotetores aos espermatozoides antes do resfriamento pode criar estresses severos para as células, resultando em injúrias. Mazur e Scheiner (1986) observaram que quando uma célula é colocada em soluções hiperosmóticas, como é o caso das que contêm agentes crioprotetores intracelulares, porém isotônicas, como as que contêm solutos impermeáveis, a célula primeiramente se retrai devido ao efluxo osmótico da água intracelular e, posteriormente aumenta em volume à medida que o soluto (crioprotetor intracelular) penetra e a água, concomitantemente, retorna para o meio intracelular. Como resultado desse aspecto da criopreservação, a célula experimenta um estresse osmótico que pode causar uma injúria osmótica significativa.

Várias razões para a injúria osmótica durante os processos de adição e remoção do crioprotetor ao meio base têm sido propostas, incluindo a ruptura mecânica da membrana celular em condições hiposmóticas e que a força de fricção entre a água e potenciais poros na membrana plasmática estariam causando injúria celular nas membranas (Gao et al., 1995).

Meryman (1970) sugeriu que a retração celular em condições hiperosmóticas é detida pelos componentes do citoesqueleto e a interação resultante entre a membrana celular contraída e o citoesqueleto danifica a célula. A contração celular induz à fusão e mudança irreversível da membrana e,

consequentemente, a área efetiva da membrana celular é reduzida, quando retornam às condições isotônicas, ocorrendo a lise celular antes da recuperação do volume normal (Steponkus e Wiest, 1979). Segundo Mazur et al. (1972), o estresse osmótico causa a perda da impermeabilidade de solutos não permeáveis, quando as células retornam às condições isotônicas, elas incham além do seu volume isotônico normal e lisam-se.

Um dos fatores mais importantes envolvidos na resistência espermática aos processos de congelamento e descongelamento é o estresse osmótico. A crioinjúria celular está freqüentemente relacionada a grandes mudanças na pressão osmótica produzidas durante os processos de congelamento e descongelamento (Mazur, 1984). Cueva et al. (1997) demonstraram que os espermatozoides eqüinos foram extensivamente lesados após serem submetidos à condições hiperosmóticas. Os resultados indicaram que o espermatozoide eqüino demonstra características específicas na sua habilidade de resistir a condições hiperosmóticas e a mudanças bruscas na pressão osmótica. Essas características estão relacionadas com a composição do meio e com a temperatura de incubação dos espermatozoides.

No presente estudo, não foram observadas diferenças entre a adição do crioprotetor em etapas única ou múltiplas, antes dos espermatozoides serem submetidos ao congelamento. Entretanto, após o descongelamento houve uma superioridade na preservação espermática quando os espermatozoides foram submetidos a condições hiperosmóticas gradativamente, ou seja, quando a adição do crioprotetor se realizou em múltiplas etapas. Provavelmente, temperaturas mais baixas conferiram aos espermatozoides menor resistência osmótica.

A análise dos resultados, sugere que a adição do crioprotetor em uma única etapa afeta mais drasticamente a integridade funcional da célula espermática do que a integridade estrutural dos espermatozoides, incluindo a motilidade e a capacidade das células espermáticas de reagirem ao teste hiposmótico. Quando a adição do crioprotetor se realizou em uma única etapa, observou-se um menor número de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico, quando comparado a adição em múltiplas etapas, o que pode indicar que a porção da cauda do espermatozoide é mais sensível aos estresses osmóticos do que os demais segmentos da célula espermática.

Um entendimento dos limites da tolerância osmótica e dos processos celulares envolvidos é essencial para desenvolver novos métodos para o processamento e armazenamento do sêmen. Futuros progressos no melhoramento da sobrevivência espermática não poderão ser atingidos simplesmente pela modificação de diluentes de criopreservação previamente definidos. Um entendimento mais fundamental dos processos bioquímicos e biofísicos que acompanham os processos de congelamento e descongelamento serão essenciais no desenvolvimento de novos bem sucedidos protocolos de criopreservação (Pommer et al. 2002). Esses pesquisadores observaram que durante a adição dos crioprotetores, as células encolhem devido ao aumento da hiperosmolaridade do meio externo e o inverso ocorre durante a remoção dos crioprotetores e sugeriram que a excursão do volume associado ao crioprotetor utilizado pode ser causa das desordens das funções celulares.

No presente estudo, a adição gradativa da dimetilformamida, um crioprotetor de baixo peso molecular, parece ter minimizado a excursão do volume celular e conseqüentemente minimizado as desordens das funções celulares. Pommer et al. (2002)

demonstraram que o espermatozoide eqüino pode suportar aproximadamente 20% de aumento e 11% de diminuição de seu volume celular isosmótico e ainda manter mais do que 70% da motilidade inicial.

A resistência à anisosmolaridade é essencial na prevenção da lise e morte celular. A capacidade do espermatozoide de responder ao ajustamento do volume celular é determinado por uma série de fatores incluindo a composição fosfolipídica da membrana, permeabilidade à água, temperatura da fase de transição dos lipídeos, atividade da bomba de Na^+/K^+ , canais de íon e elementos do citoesqueleto (Pommer et al. 2002). Esses pesquisadores demonstraram que os espermatozoides eqüinos são altamente susceptíveis ao estresse osmótico.

Ball e Vo (2001) reportaram limitada tolerância osmótica do espermatozoide eqüino quando submetidos às condições anisosmolares e observaram que a adição e a rápida remoção de um molar de glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido ou propilenoglicol resultaram em um declínio significativo na motilidade e viabilidade espermática. Dentre esses crioprotetores, o etilenoglicol tem o efeito menos detrimental, seja na viabilidade, seja na motilidade dos espermatozoides avaliada após a rápida adição e remoção desses crioprotetores. Dos quatro crioprotetores testados na espécie eqüina, a adição e a remoção do glicerol resultou em um estresse osmótico mais acentuado, como indicado pelas alterações na motilidade, viabilidade e integridade acrossomal.

A resistência à anisosmolaridade é essencial para prevenir a lise e a morte celular. Quando as células espermáticas são expostas a mudanças nas condições osmóticas, parece haver o desencadeamento de uma série de eventos que influenciam a habilidade das células de manterem suas funções celulares (Linfors et al., 2002). Esses pesquisadores

observaram que um estresse físico mediado pelas condições anisomóticas estimula a tirosina Kinase à fosforilação de algumas proteínas espermáticas. Há evidências nas células somáticas que o estresse osmótico pode induzir a fosforilação da tirosina da caveolina-1, a principal família protéica, que funciona como um suporte protéico da membrana e está envolvido na resposta ao estresse celular.

4. CONCLUSÕES

A adição do crioprotetor, em múltiplas etapas, ao meio base, foi mais eficaz na preservação das motilidades espermáticas total e progressiva, integridade funcional da membrana plasmática, em todos os tempos testados, menos lesiva às integridades estruturais das membranas plasmática e acrossomal e promoveu maior resistência dos espermatozóides ao teste de termo-resistência, quando comparada à adição do crioprotetor em única etapa. Essa superioridade foi independente da curva de congelamento adotada.

A curva de congelamento que adotou o resfriamento gradativo do sêmen diluído de -0,25°C/minuto da temperatura ambiente até 5°C foi mais eficaz na preservação das motilidades espermáticas total e progressiva, integridade funcional da membrana plasmática, em todos os tempos testados, menos lesiva às integridades estruturais das membranas plasmática e acrossomal e promoveu maior resistência dos espermatozóides ao teste de termo-resistência, quando comparada à curva de congelamento sem resfriamento prévio. Essa superioridade foi independente da forma de adição do crioprotetor ao meio base.

Injúrias significativas são ocasionadas pelo estresse osmótico e pelo método de congelamento dos espermatozóides.

O protocolo de congelamento que associa a introdução gradativa do crioprotetor ao meio

diluidor base a uma curva de congelamento com resfriamento prévio é o mais eficiente na preservação da viabilidade espermática equina, avaliada *in vitro*, após o descongelamento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O. et al. Improvement of post-thaw stallion spermatozoa quality with the utilization of dimethyl formamide as a cryoprotector. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004. *Proc...*Porto Seguro: Brazilian College of Animal Reproduction, 2004, p. 500.

AMANN, R.P. Fertility of cryopreserved sperm. *Contraception Fertility Sexuality*, v. 19, p. 946-954, 1991.

AMANN, R.P. Can the fertility potencial of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology*, v. 10, p. 89-95, 1989.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American Journal Veterinary Research*, v. 62, p. 508-510, 2001.

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

BARBIERI, M.A.; VEISAGA, M.L.; PAOLICHI, F. et al. Afinity sites for B-glucoronidase on the surface of human spermatozoa. *Andrologia*, v. 28, n. 6, p. 327-333, 1996.

BARBACINI, S.; MARCHI, V.; ZAVAGLIA, G. Equine frozen semen: results obtained in Italy during the 1994-1997 period. *Equine Veterinary Education*, v. 11, n. 2, p. 109-112, 1999.

BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididimal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative*

Medicine and Veterinary Science, v. 21, n. 1, p. 47-51, 1957.

BARRY, A.B.; ANTHONY VO. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, v.22, p. 1061-1069, 2001.

CHRISTENSEN, P. *Evaluation of equine spermatozoa: The use of transmission electron microscopy and an in vitro acrosome reaction*. 1995. 134f. Thesis (Ph.D.) – The Royal Veterinary and Agricultural University, Department of Anatomy and Physiology, Copenhagen.

COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D. P. et al. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, v. 22, n. 1, p. 25-38, 1984.

COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; SCHROEDER, F. et al. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 56, p. 127-132, 2000.

CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, v. 42, n. 2, p. 351-360, 1994.

COTORELLO, A.C.P. *Criopreservação de sêmen eqüino utilizando associação de etilenoglicol e glicerol*, 2002. 47f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COTORELLO, A.C.P.; HENRY, M.; FERREIRA, M.K.V. et al. Efeito da associação do etilenoglicol na criopreservação de sêmen eqüino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2001. p. 456 – 457.

CRISTANELLI, M.J.; AMANN, E.L.; SQUIRES, E. L. et al. Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of

frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 24, n. 6, p. 681-686, 1985.

CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology Reproduction*, v. 41, n. 4, p. 635-641, 1989.

CUEVA, F.I.C. DE LA; RIGAU; T. PUJOL; R. et al. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, v.48, n. 3-4, p. 301-315, 1997.

DELL'AQUA JÚNIOR, J.A.; PAPA, F.O. Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelamento de sêmen eqüino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14, 2001, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2001. p. 460-462.

DEMICK, D.S.; VOSS, J.L.; PICKETT, B. W. Effect of cooling, storage, glycerolization and spermatozoal numbers on equine fertility. *Journal of Animal Science*, v. 43, n. 3, p. 633-637, 1976.

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, v. 27, n. 3, p. 247-268, 1990.

GAO, D.Y.; LIU, J.; LIU, C. et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, v. 10, n. 6, p. 1109-1122, 1995.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A. et al. Assesment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biology of Reproduction*, v. 34, n. 1, p. 127-138, 1986.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A. S. L. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 277-279, 2002.

GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, M.K.L.; NELSON, D.S. In: NATIONAL ASSOCIATION OF ANIMAL BREEDERS TECHNICAL CONFERENCE ON

- ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION, 8, 1980. *Proc...Milwaukee*, 1980, p.59.
- GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 12, n. 1, p. 119-129, 1996a.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Reproduction and Technology*, v. 12, n. 1, p. 131-145, 1996b.
- HAMMERSTED, R.H.; KEITH, A.D.; SNIPES, W. et al. Use of spin labels to evaluate effects of cold shock and osmolality and osmolality on sperm. *Biology of Reproduction*, v. 18, n. 4, p. 686-696, 1978.
- HAMMERSTED, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, v. 29, n. 1, p. 26 - 38, 1992.
- HANCOCK, J.L. The structure of spermatozoa. *Veterinary Record*, v.69, n. 36, p.996-997, 1957.
- HARKEMA, W.; BOYLE, M.S. Use of fluorescent stains to assess membrane integrity of equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12, 1992. *Proc...Den Haag*: 1992, p. 1424-1426.
- 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, n. 1, p. 343-352, 1990.
- HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. et al. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*, v. 28, n. 1, p. 47-53, 1996.
- HENRY, M.; SNOECK, P.P.N.; COTORELLO, A. C. P. Post-thaw spermatozoa plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 245-248, 2002.
- HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing – observations with experimental cryomicroscopy. *Biology of Reproduction*, v. 46, n. 6, p. 1086-1094, 1992.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, n.1, p. 3-22, 2000a.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Reproduction Fertility and Development*, v. 9, p. 309-319, 2000b.
- JASKO, D.P. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Veterinaria*, 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 of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.
- JULIANI, G.C.; SNOECK, P.P.N.; HENRY, M. Efeito da trealose ou rafinose associada a acetamida/metilcelulose na criopreservação de sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, n. 3, p. 355-356, 2003.
- JULIANI, G.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Freezing of equine semen in extenders with low density lipoproteins. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004. *Proc...Porto Seguro: Brazillian College of Animal Reproduction*, 2004, p. 498.
- KATILA, T.; KARESKOSKI, M. Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa. *Pferdeheilkunde*, v. 22, p. 193-200, 2006.
- KENNEY, R. M. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. *Annual Convention American Association Equine Practitioners*, v. 21, p. 327-336, 1975.
- LEIBO, S.P.; BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: GAGNON, C. (Ed.). *The male gamete: from basic science to clinical applications*. Viena: Cache River, 1999. p. 501-516.
- LINFOR, J.J.; POMMER, A.C.; MEYERS, S.A. Osmotic stress induces tyrosine phosphorylation of equine sperm. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 355-358, 2002.
- LOVELOCK, J.E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochemistry*, v. 58, p. 618 - 622, 1954.

- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZELA, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supl. 27, p. 47-51, 1979.
- MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; CHU, E.H.Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Experimental Cell Research*, v. 71, p. 345-355, 1972.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of physiology*, v. 247, n. 16, p. 125-142, 1984.
- MAZUR, P.; SCHNEIDER, U. Osmotic responses of preimplantation mouse and bovine embryos and their cryobiological implications. *Cell Biophysics*, v. 8, p. 259-284, 1986.
- McKINNON, A.O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Australian Equine Veterinarian*, v. 14, n. 4, p. 156-175, 1996.
- MEDEIROS, A. S. L.; GOMES, G. M.; CARMO, M. T. et al. Cryopreservation of stallion using different amides. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 273-276, 2002.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M.; ZÚCCARI, C.E. S. N. Equine sperm cell integrity changes during incubation at 5°C. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004. *Proc...*Porto Seguro: Brazilian College of Animal Reproduction, 2004. p. 510.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. *Aquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51. n. 1, p. 71-78, 1999.
- MERYMAN, H.T. The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. In: WOLSTENHOLME, G. E. W.; O'CONNOR, M. (Eds.) *The Frozen Cell*, London: 1970, p. 51-67.
- NEILD, D.M.; CHAVES, M.G.; FLORES, M. et al. The HOS test and its relationship to fertility. *Andrologia*, v. 32, n. 6, p. 351-355, 2000.
- PAPA, F.O.; SANTOS, T.B.; MACEDO, L.B. et al. Influência da distância entre o nível do nitrogênio líquido e as palhetas de sêmen durante o processo de congelamento sobre os parâmetros espermáticos de sêmen de eqüino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, n. 3, p. 368-370, 2003.
- PAPA, F.O.; DELL'AQUA JÚNIOR. Efeito do tipo de envasamento e método de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade de sêmen congelado eqüino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2001. p. 458-460.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v. 38, n. 2, p. 209-222, 1992.
- PHILLIPS, P.H.; LARDY, H.A. A yolk buffer pabulum for the preservation of bull semen. *Journal of Dairy Science*, v. 23, n.5, p. 399-404, 1940.
- PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. O., VOSS, J. L. (Eds.). *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. p. 769-789.
- PICKETT, B. W.; SULLIVAN J. J.; BYERS, W. W. et al. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertility and Sterility*, v. 26, n. 2, p. 167-174, 1975.
- POMMER, A. C.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S. A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*, v. 58, n.7, p. 1373-1384, 2002.
- RIDEOUT, M. I.; BURNS, S. J.; SIMPSON, R. B. Influence of bacterial products on the motility of stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supl. 32, p. 35-40, 1982.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SANTOS, T. B.; PAPA, F. O.; MACEDO, L. P. et al. Estudo do efeito da adição de diferentes antibióticos e associações sobre a motilidade e viabilidade espermáticas e inibição do crescimento bacteriano no sêmen congelado eqüino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 27, n. 3, p. 357-358, 2003.
- SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; SANTOS, L.M. G. Avaliação de crioprotetores no congelamento de sêmen eqüino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte:

- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2001. p. 454-455.
- 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 da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- SQUIRES, E.L.; CROCKETT, E.C.; GRAHAM, J.K. et al. Effect of centrifugation and cooling prior to freezing on post-thaw motility of equine spermatozoa [on line]. Colorado, 2000. Disponível em <<http://www.cvmbs.colostate.edu/physio/abstract/els3.html>>. Acesso em 24/08/2000.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; VANDERWALL, D. K. et al. *Cooled and frozen stallion semen*. Fort Collins: Colorado State University, 1999. 80p. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bulletin. N. 9).
- STEPONKUS, P. A.; WIEST, S. C. Freeze-thaw induced lesions in the plasma membrane. In: LYONS, J. M.; GRAHAM, D.; RAISON, J. K. (Eds.). *Low temperature stress in crop plants: The role of the membrane*. New York: Academic Press, 1979, p. 231-254.
- TAMULI, M. K.; WATSON, P. F. Effect of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress and hypoosmotic stress in boar spermatozoa incubated for up to 24 hours. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12, 1992. *Proc...*Den Haag, 1992, p. 1484-1486.
- TODD, P.; ARNS, M. J.; CHENOWETH, P. et al. Influence of seminal plasma and processing on cold-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n. 1-2, p. 335-336, 2001.
- VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P. et al. Centrifugation and addition of glicerol at 22°C instead of 4°C improve semen motility and fertility. *Cryobiology*, v. 35, n. 4, p. 354, 1997.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J. M. et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, v. 58, n. 2-4, p. 249-251, 2002.
- VOSS, J. L.; PICKETT, B. W.; SQUIRES, E. L. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 178, n. 3, p. 287-290, 1981.
- WATSON, P. F. The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep freezing. *Journal Thermal Biology.*, v. 1, p.137-141, 1976.
- WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm membranes. In: CLARK, A., MORRIS, G.J. (Eds.). *Effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press, 1981. p. 189 – 218.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.
- ZÚCCARI, C. E. S. N. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina, 1998. 121f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

7 – ANEXOS

Tabela A.1. Médias, desvios e erros padrões pós-descongelamento de espermatozoides eqüinos congelados por várias técnicas e submetidos ao teste de termo-resistência

TRATAMENTO	TEMPO (minutos)	MÉDIA	DESVIO	ERRO
1	0	31,6	12,5	5,6
1	30	20,0	10,6	4,7
1	60	13,0	7,6	3,4
1	90	9,9	7,0	3,1
1	120	5,0	8,7	3,9
1	150	1,0	2,2	1,0
2	0	49,0	23,4	10,4
2	30	28,0	17,5	7,8
2	60	21,0	16,7	7,5
2	90	15,0	10,0	4,5
2	120	11,0	10,2	4,6
2	150	2,0	2,7	1,2
3	0	47,0	9,6	4,3
3	30	39,0	14,3	6,4
3	60	26,0	17,8	8,0
3	90	12,0	7,6	3,4
3	120	12,0	14,4	6,4
3	150	6,0	6,5	3,0
3	180	6,0	10,8	4,8
3	210	3,0	6,7	3,0
3	240	4,0	8,9	4,0
3	270	4,0	8,9	4,0
3	300	3,0	6,7	3,0
3	330	2,0	4,5	2,0
4	0	58,5	10,8	4,8
4	30	39,0	22,5	10,0
4	60	33,0	24,4	10,9
4	90	24,0	22,2	9,9
4	120	15,0	16,8	7,4
4	150	12,0	16,4	7,3
4	180	11,0	14,3	6,4
4	210	6,0	10,8	4,8
4	240	7,0	15,7	7,0
4	270	3,0	6,7	3,0
4	300	1,0	2,2	1,0

T1: Adição do crioprotetor em uma única etapa sem resfriamento prévio; T2: Adição do crioprotetor em múltiplas etapas sem resfriamento prévio; T3: Adição do crioprotetor em uma única etapa sem resfriamento prévio; T4: Adição do crioprotetor em múltiplas etapas com resfriamento prévio.

Tabela A.2. Análise de variância – comparação da motilidade total entre os tratamentos

MT					
Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	35	0,8529053 E+10			
Total de Redução	18	0,3968940 E+10	0,2204967 E+09	0.82	*****
RESF	1	0,1120408 E+10	0,1120408 E+09	6.31	0.0224
RESF*FORMA	1	9334043.	9334043.	0.05	*****
** ERRO(B) **	16	0,2839198 E+10	0,1774499 E+09		
Resíduo	17	0,4560113 E+10	0,2682419 E+09		

C. V. 30.642

MT- motilidade total; C.V.- coeficiente de variação.

Tabela A.3. Análise de variância – comparação da motilidade progressiva entre os tratamentos

MP					
Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	35	0,8341277 E+10			
Total de Redução	18	0,3772754 E+10	0,2095975 E+09	0.78	*****
RESF	1	0,1284052 E+10	0,1284052 E+10	8.28	0.0105
RESF*FORMA	1	6962562.	6962562.	0.04	*****
** ERRO(B) **	16	0,2481740 E+10	0,1551088 E+09		
Resíduo	17	0,4568522 E+10	0,2687366 E+09		

C. V. 34.546

MP- motilidade progressiva.

Tabela A.4. Análise de variância – comparação da porcentagem de espermatozoides íntegros entre os tratamentos

INTEGROS					
Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	35	0,5286255 E+10			
Total de Redução	18	0,3217687 E+10	0,1787604 E+09	1.47	0.2164
RESF	1	0,1466763 E+09	0,1466763 E+09	0.79	*****
RESF*FORMA	1	0,1125933 E+09	0,1125933 E+09	0.61	*****
** ERRO(B) **	16	0,2958418 E+10	0,1849011 E+09		
Resíduo	17	0,2068568 E+10	0,1216805 E+09		

C. V. 28.542

Tabela A.5. Análise de variância – comparação da porcentagem de espermatozoides lesados entre os tratamentos

LESADOS					
Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	35	0,1015432 E+11			
Total de Redução	18	0,7052992 E+10	0,3918329 E+09	2.15	0.0609
RESF	1	0,3064508 E+10	0,3064508 E+10	12.90	0.0023
RESF*FORMA	1	0,1874526 E+09	0,1874526 E+09	0.79	*****
** ERRO(B) **	16	0,3801031 E+10	0,2375645 E+09		
Resíduo	17	0,3101331 E+10	0,1824312 E+09		
C. V.	27.926				

Tabela A.6. Análise de variância – comparação da porcentagem de espermatozoides semi-lesados entre os tratamentos

SEMI-LESADOS					
Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
Total	35	107070.2			
Total de Redução	18	57511.94	3195,108	1.10	0.4269
RESF	1	41173.61	41173.61	40.98	0.0000
RESF*FORMA	1	263,6614	2.636.614	0.26	*****
** ERRO(B) **	16	16074.67	1,00E+06		
Resíduo	17	49558.25	2.915.191		
C. V.	53.996				

Tabela A.7. Análise de variância – comparação de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HO) entre os tratamentos nos três tempos testados

TESTE HIPOSMÓTICO (HO)					
Fontes de Variação	GL	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Sig.
TEMPO	2	0,1400699 E+10	0,7003195 E+09	44,59	signif.
TEMPO*FORMA	2	4625000.	2312500	0,147250109	ns
TEMPO*RESFR	2	0,7054167 E+08	35270830	2,254895605	ns
TEMPO*RESFR*FORMA	2	0,3704167 E+08	1.850.830	1,179327242	ns
** ERRO(c) **	64	1005092630	1,57E+07		