

**Jair Perez Osorio**

**EFEITO DA ADIÇÃO FRACIONADA DE DIMETIL FORMAMIDA  
E DAS CURVAS DE CONGELAMENTO NA VIABILIDADE *IN*  
*VITRO* PÓS-DESCONGELAMENTO DO ESPERMATOZÓIDE  
EQÜINO**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para 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**

**2006**

P438e      Perez Osorio, Jair, 1977-  
              Efeito da adição fracionada de dimetil formamida e das curvas de congelamento na  
              viabilidade *in vitro* pós-descongelamento do espermatozóide eqüino / jair perez osorio.-  
              2006.  
              61p. : 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 – Criopreservação – Teses. 3 sêmen  
              Congelado – Teses. I. Henry, Marc Roger Jean Marie. Universidade Federal de Minas  
              Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 926





“Todo lo que el hombre quiere alcanzar esta en la fuerza,  
voluntad, sacrificio y fe que tiene en su corazón, solo  
si ama a Dios, porque el le dará grandes bendiciones”

*Jair Perez Osorio*

Dedico esta tesis a Dios por iluminar mis sentidos, darme mucha fe y humildad, a la memoria de mi padre Daniel Ramón, al amor, cariño y afecto de mi madre Carmen Maria, a mi hermano Pachi, y a toda mi familia.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar minha mente e me oferecer muitas bênção

À minha mãe Carmen Maria Osorio Ruiz por ser a fonte de inspiração e de amor neste trabalho.

À memória do meu pai Daniel Ramon Perez Mena pela herança tão maravilhosa que me deixou os conhecimentos ensinados.

À meu irmão por seu apoio, amor e laço de amizade tão grande.

À UFMG, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao Professor Marc Roger Jean Marie Henry, pela paciência, orientação e dedicação.

Ao grupo de professores da área de reprodução animal Jose Monteiro da Silva Filho, Alan Maia Borges, Vicente Ribeiro do Vale Filho, Monique de Albuquerque Lagares, Antônio de Pinho Marques Júnior pelos conhecimentos ensinados.

Ao Laboratório de Reprodução animal e especialmente aos técnicos Dario e Marcinha pela valiosa colaboração.

Ao Haras Três Pontas e o proprietário Ênio M. por ter me oferecido a oportunidade de realizar meu experimento.

Ao Geraldo Juliani, por sua grande amizade e valiosa colaboração.

Ao Professor Germán Arturo Bohórquez, a sua esposa Luz Helena Grondona e a todas minhas irmãs Katy, Karen, Carito e Gucci, por sua grande dedicação, amizade, carinho, colaboração e apoio nos momentos mais difíceis durante o curso.

Ao Professor Geraldo Heleno pela ajuda na revisão da dissertação.

Ao Professor Rafael Faleiros pela grande amizade, confiança, e boa vontade na revisão da dissertação.

À Professora Ângela pela ajuda na análise estatística.

Aos meus amigos Márcio, Ivis, André, Serginho, Paloma, Amandinha, Mariana, Bruna, Alessandra, Fernanda pela grande colaboração e apoio nos momentos difíceis. À todas as pessoas que fizeram possível este sonho feito realidade.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b>	11
<b>ABSTRACT</b>	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
<b>2.1 Princípios da criopreservação</b>	15
2.1.1 <i>Choque térmico</i>	16
2.1.2 <i>Efeito solução</i>	17
2.1.3 <i>Formação de cristais de gelo</i>	18
<b>2.2 Extensores seminais</b>	19
<b>2.3 Técnica de Congelamento de Sêmen de Eqüinos</b>	23
2.3.1 <i>Coleta e avaliação do sêmen</i>	23
2.3.2 <i>Centrifugação</i>	23
2.3.3 <i>Plasma seminal</i>	24
2.3.4 <i>Diluição com meio extensor</i>	25
2.3.5 <i>Crioprotetores</i>	25
2.3.6 <i>Envasamento</i>	27
2.3.7 <i>Taxas de resfriamento</i>	28
2.3.8 <i>Congelamento</i>	29
2.3.9 <i>Descongelação</i>	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	30
<b>3.1 Animais</b>	30
<b>3.2 Coleta de sêmen</b>	31
<b>3.3 Avaliação espermática pré-congelamento</b>	31
<b>3.4 Processo de congelamento e descongelamento do sêmen</b>	31
<b>3.5 Tratamentos e curvas de congelamento</b>	32
<b>3.6 Avaliação da osmolaridade dos meios diluidores</b>	33
<b>3.7 Métodos de avaliação espermática pós-descongelação</b>	33
3.7.1 <i>Motilidade total e progressiva</i>	33
3.7.2 <i>Morfologia espermática</i>	33
3.7.3 <i>Teste de termoresistência</i>	34
3.7.4 <i>Avaliação da integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides</i>	34



3.7.5	<i>Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal da cabeça dos espermatozóides</i>	34
<b>3.8</b>	<b>Análise estatística</b>	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	36
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	46
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	50
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	51

---

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características físicas do sêmen a fresco e reatividade ao teste hiposmótico de seis garanhões, imediatamente pós-colheita	36
Tabela 2	Porcentagem de Motilidade total de espermatozóides eqüinos pós-descongelamento	36
Tabela 3	Porcentagem de motilidade progressiva de espermatozóides eqüinos pós-descongelamento	38
Tabela 4	Vigor espermático pós-descongelamento	38
Tabela 5	Porcentagem de espermatozóides íntegros pós-descongelamento	40
Tabela 6	Porcentagem de espermatozóides semi lesados pós-descongelamento	40
Tabela 7	Porcentagem de espermatozóides lesados pós-descongelamento	41
Tabela 8	Porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico pós-descongelamento	42
Tabela 9	Correlações entre os parâmetros espermáticos avaliados imediatamente após o descongelamento	46

---

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Motilidades total e progressiva após o descongelamento de espermatozóides eqüinos congelados com três tempos de adição do crioprotetor e diferentes curvas de congelamento	39
Figura 2	Motilidades progressivas médias pós-descongelamento de espermatozóides eqüinos submetidos a curva de congelamento número 1 nos diferentes tempos de adição do crioprotetor	43
Figura 3	Motilidades progressivas médias pós-descongelamento de espermatozóides eqüinos submetidos a curva de congelamento número 2 nos diferentes tempos de adição do crioprotetor	44
Figura 4	Motilidades progressivas médias pós-descongelamento de espermatozóides eqüinos submetidos a curva de congelamento número 3 nos diferentes tempos de adição do crioprotetor	45

---

#### LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Composição do extensor básico utilizado INRA 82 com 20m moles hepes e dos extensores derivados D1 e D2	58
Anexo 2	Preparação da solução hiposmótica de sacarose a 100 mosmol/l	59

Anexo 3 Soluções de estoque e de trabalho utilizadas na técnica de sondas 60  
fluorescentes para a avaliação da integridade da membrana plasmática e  
acrossomal de células espermáticas eqüinas

Anexo 4 Fluxograma do processo de congelamento e descongelamento da célula 61  
espermática eqüina

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de três tempos de adição fracionada de 5%, da dimetil formamida (DMF) ao meio diluidor base INRA 82 modificado, a sua interação com o tempo de equilíbrio e a curva de congelamento na criopreservação de espermatozoides eqüinos. Um ejaculado de seis garanhões foi utilizado para testar três tempos de adição da dimetil formamida: Tempo 1: adição da décima parte da dimetil formamida a cada minuto no tempo de dez minutos; Tempo 2: adição da décima parte da dimetil formamida à cada dois minutos no tempo de vinte minutos; Tempo 3: adição da décima parte da dimetil formamida a cada três minutos no tempo de trinta minutos. Completando-se o período médio de uma hora e oito minutos em temperatura ambiente desde o início até a adição do crioprotetor todas as amostras foram resfriadas até 5°C utilizando uma máquina computadorizada a uma taxa de 0,25°C/min. Foram testadas três diferentes procedimentos para o congelamento: a) sem tempo de equilíbrio adicional à 5°C e congelamento 4cm acima do nível de nitrogênio líquido por quinze minutos, e posterior submersão das amostras no nitrogênio líquido; b) com tempo de equilíbrio adicional a 5°C de quarenta e cinco minutos e congelamento 4cm acima do nível de nitrogênio líquido por quinze minutos, e posterior submersão das amostras no nitrogênio líquido; c) com tempo de equilíbrio adicional à 5°C de quarenta e cinco minutos e congelamento computadorizado a uma taxa de -10°C/min até -127°C por quinze minutos, e posterior submersão das amostras no nitrogênio líquido. O descongelamento foi feito a 52°C por dez segundos, seguidos de imersão em banho-maria a 37°C por trinta segundos. Após o descongelamento foram avaliados os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e vigor espermático em microscopia óptica, com aumento de 400X. A integridade da membrana plasmática da cauda e da cabeça foi avaliada pelo teste hiposmótico e pela coloração de fluorescência respectivamente. Os espermatozoides foram submetidos ao teste de termoresistência. Não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os três tempos de adição nem as curvas de congelamento. Os resultados permitem concluir que a mudança do tempo de adição do crioprotetor de forma fracionada e da curva de congelamento não altera a viabilidade espermática eqüina avaliada *in vitro*.

Palavras chaves: crioprotetor, criopreservação, eqüino, sêmen.

## ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the efficiency of three times of fractionate addition of 5%, the dimethyl formamide to the half seminal extender modified base INRA 82, and its interaction with the time of balance and the rates of freezing in the criopreservation of equine spermatozoa. Ejaculates of six stallions was used to test three times of addition of the dimethyl formamide; Time 1: addition of the tenth part of dimethyl formamide to each the one minute in the time of ten minutes; Time 2: addition of the tenth part of dimethyl formamide to each the two minutes in the time of twenty minutes; Time 3: addition of the tenth part of dimethyl formamide to each the three minutes in the time of thirty minutes. Completing the average period of one hour and eight minutes in ambient temperature since the beginning until addition of the crioprotectan all the samples had been cooled until 5°C using one scheme computerized to a rates of cooling 0,25°C/min. 3 different procedures for the freezing had been tested: a) without time of additional balance 5°C and freezing 4cm above of the nitrogen level fifteen minutes, and posterior submersion of the samples in nitrogen liquid; b) with time of additional balance 5°C of forty five minutes and freezing 4cm above of the nitrogen level fifteen minutes, and posterior submersion of the samples in nitrogen liquid e; c) with time of additional balance 5°C of forty five minutes and freezing computerized to one rates of -10°C/min ties -127°C per fifteen minutes, and posterior submersion of the samples in nitrogen liquid. The thawing was made 52°C per ten seconds, followed of immersion in bath-Maria 37°C per thirty seconds. Immediately post thaw the parameters of total motility, motility progressive and spermatic vigor were evaluated under microscopy 400X. The integrity of the plasmatic membrane of the tail was evaluated through the hiposmotic swelling test and the functional and structural sperm membrane integrity were evaluate by the fluorescent dyes, carboxyfluorescein diacetate and propidium iodide respectively. The spermatozoa were also evaluated in the temperature resistance. Was not observed significant difference ( $P > 0, 05$ ) enters the three times of addition and enters the freezing rates. The results allow concluding that the changes of the time of addition of the crioprotectan of fractionate form and the curve of freezing did not modify the equine spermatic viability evaluated in vitro.

Key words: cryoprotectants, cryopreservation, equine semen.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as biotecnologias da reprodução animal, a criopreservação é uma ferramenta que oferece vantagens para preservar a viabilidade espermática por longos períodos. Esta técnica permite a utilização de garanhões de alto potencial genético sem ter como limitação o transporte de éguas por longas distâncias até o garanhão ou o envio de sêmen refrigerado, com tempo limitado de viabilidade, até as éguas. Contudo a utilização de sêmen congelado eqüino ainda é limitada, devida a alta sensibilidade da célula espermática ao choque térmico e ao estresse osmótico. Esta alta sensibilidade leva durante o processo de congelamento à mudanças nas membranas plasmáticas reduzindo a viabilidade espermática pós-descongelamento. Por estas razões os protocolos de congelamento disponíveis atualmente não proporcionam taxas de prenhez satisfatórias. Adicionalmente, tem se observado a influencia direta da raça, idade, e principalmente a individualidade dos garanhões no sucesso do processo de criopreservação.

No processo de congelamento e descongelamento, a célula espermática sofre mudanças na sua estrutura,

resultando, entre outros danos, na perda da integridade da função da membrana plasmática (Parks e Graham, 1992). Durante o resfriamento rápido a célula espermática eqüina sofre mudanças irreversíveis (Watson et al., 1987). Essas mudanças são chamadas de choque térmico e resultam na diminuição da motilidade e do metabolismo dos espermatozoides, associadas à perda de proteínas e enzimas celulares (Blackshaw & Salisbury 1957; Quinn et al., 1969). A ruptura das membranas plasmática externa e interna, resultando em mudanças na permeabilidade, tem sido proposta como mecanismo conseqüente ao choque térmico (Blackshaw e Salisbury 1957; Watson et al., 1987).

A susceptibilidade variável dos espermatozoides de diferentes espécies ao choque térmico é geralmente atribuída às diferenças na composição de suas membranas plasmáticas. Existe uma relação direta entre a taxa de colesterol: fosfolipídios, ou ácidos graxos insaturados presentes nas membranas plasmáticas do espermatozoide e sua resistência ao choque térmico (Poulos et al., 1973; Darin et al., 1974). A alta concentração de ácido araquidônico insaturado dos fosfolipídios encontrada nos

espermatozóides eqüinos, diferente do que é encontrado em outras espécies, pode estar correlacionada com a baixa resistência do espermatozóide eqüino ao choque térmico (Chow et al., 1986).

Na criopreservação, são utilizadas substâncias para proteger a estrutura dos espermatozóides, como os agentes crioprotetores. Esses podem ser classificados como permeantes ou intracelulares, ou não-permeantes ou extracelulares. Os crioprotetores permeantes são o glicerol, o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido e a dimetilformamida, entre outros, que são constituídos por moléculas de baixo peso molecular, necessitando estar em altas concentrações nos meios diluidores. Os crioprotetores não-permeantes, constituídos de moléculas de elevado peso molecular, são os açúcares como a sacarose e a rafinose, as proteínas e lipoproteínas contidas no leite, na gema de ovo e o soro sangüíneo, entre outros. Esses crioprotetores são usados em baixas concentrações (Jasko, 1994; Rodrigues, 1992).

Segundo Medeiros et al. (2003), as diferentes amidas, como a dimetil formamida e a metil formamida, quando adicionadas aos meios de

congelamento, em concentrações de 5%, protegem a célula espermática eqüina das crioinjúrias causadas pelo processo de descongelamento. Ainda segundo os autores, essas duas amidas exerceriam melhor efeito e melhor atividade crioprotetora que o glicerol, para os espermatozóides eqüinos.

A interação entre o diluidor, crioprotetor, curvas de resfriamento e descongelamento tem sido considerada como um dos principais fatores para alcançar o sucesso no processo de criopreservação de sêmen eqüino (Jasko, et al., 1992; Heitland, et al., 1996). A escolha da curva de congelamento apropriada depende do diluidor utilizado (Graham, 1996). Para os diluidores à base de leite e gema de ovo há a necessidade de resfriamento controlado  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $5^{\circ}\text{C}$ , antes do congelamento em vapor de nitrogênio. Já os diluidores à base de gema de ovo não necessitam de resfriamento lento e tempo de equilíbrio, podendo ser congelados diretamente da temperatura ambiente em vapor de nitrogênio (Cochram et al., 1984).

Atualmente, as pesquisas procuram incorporar à meios diluidores novas moléculas ou associações de moléculas

para melhorar a criopreservação do sêmen equino. O objetivo é reduzir os danos e os efeitos nocivos do resfriamento, congelamento e descongelamento sobre a viabilidade da célula espermática.

Em experimento realizado recentemente empregando um diluidor base com 5% de dimetil formamida adicionado ao sêmen gradativamente, seguido de uma curva de resfriamento na velocidade de 0,25°C/min da temperatura ambiente até 5°C e permanecendo em equilíbrio por uma hora, precedendo o congelamento no vapor de nitrogênio, demonstrou-se uma melhora significativa na motilidade e diminuição no grau de lesão dos espermatozoides (Mello, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da adição fracionada do crioprotetor dimetil formamida ao meio extensor base INRA 82, e assim dar continuidade ao trabalho de Mello (2005). A hipótese em teste é que seria possível aprimorar ainda mais a viabilidade espermática pós-descongelamento aumentando o tempo da adição do crioprotetor de forma fracionada e que haveria uma interação entre o método de adição fracionada, tempo de equilíbrio a 5°C e a curva de congelamento.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Princípios da criopreservação**

O objetivo do processo da criopreservação é a manutenção do metabolismo celular em estado de quiescência, permitindo assim a conservação de células e tecidos por longos períodos. Seidel (1996) relatou que a criopreservação tem como princípio básico a necessidade de se remover boa parte do conteúdo de água da célula antes de ser realizado o processo de congelamento, sem, no entanto, remover a água em excesso, o que pode ser deletério à célula.

Para obter sucesso na criopreservação de espermatozoides equinos deve ser misturado ao sêmen um extensor seminal apropriado, para retirar o plasma seminal e concentrar os espermatozoides através da centrifugação. O precipitado deve ser ressuspenso em um extensor para o congelamento contendo um crioprotetor. Taxas de refrigeração e, posteriormente, taxas de congelamento adequadas devem ser utilizadas para manter a viabilidade espermática pós-descongelamento (Heitland et al., 1996). Para que um espermatozoide tenha a capacidade de fertilizar o

ovócito ele deve ter as seguintes características após processo de criopreservação e descongelamento:

- Metabolismo para a produção de energia;
- Motilidade progressiva;
- Acrossoma intacto contendo enzimas que são necessárias para a penetração do espermatozóide através das estruturas que envolvem o ovócito;
- Proteínas na membrana plasmática que são importantes para a sobrevivência dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino para a fixação do espermatozóide à membrana plasmática do oócito durante a fertilização (Squires et al., 1999).

Em estudo têm se mostrado que os danos e lesões que ocorrem nos tecidos durante os processos de criopreservação e aquecimento são devido principalmente a três importantes fatores; a) ao choque térmico; b) a efeito solução; c) a formação de cristais de gelo (Pickett e Amann, 1987).

### *2.1.1 Choque térmico*

Os espermatozoides quando se encontram em um meio adequado não sofrem danos com a queda da temperatura corporal 37°C até a temperatura ambiente 20°C (Keith, 1998). O estresse inicial do espermatozóide se dá quando ocorre o decréscimo da temperatura de 20°C até a temperatura de 5°C (Squires et al., 1999). Nesta faixa de temperatura ocorre a fase de transição da membrana plasmática que passa de uma fase líquida cristalina para o estado de gel (Graham, 1996). Para diminuir os efeitos nocivos que podem advir desta mudança é necessário controlar as taxas de resfriamento entre as temperaturas de 19°C e 8°C, além disto, deve-se adicionar ao meio extensor substâncias lipídicas como lipoproteínas de baixa densidade ou gema de ovo, para protegerem as células (Graham, 1996). Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, a célula espermática sofre o fenômeno conhecido como choque térmico (Graham, 1996).

O rápido resfriamento do espermatozóide equino até atingir a temperatura de 5°C induz danos irreversíveis, caracterizados por padrões anormais de motilidade (movimentos



circulares), rápida perda da motilidade, alteração ou danos no acrossoma, membrana plasmática, redução do metabolismo e perda dos componentes intracelulares. Todas essas alterações na célula espermática são partes deste fenômeno (Watson, 1995).

Várias estruturas são envolvidas pelas membranas plasmáticas e acrossomal, entre elas estão as mitocôndrias que também sofrem com frequência danos causados pelo choque térmico com frequência (Watson e Plumer, 1985; Watson, 1995). As mudanças nas membranas que advém de um resfriamento inadequado são a reorganização da bicamada lipídica de fosfolipídios, colesterol e proteínas (Ortman e Rodriguez-Martinez, 1994). Segundo Watson, (1996) os efeitos do choque térmico são provocados por uma mudança na organização dos fosfolipídios, devido à mudança na membrana plasmática afetando a sua fluidez.

A maior proporção de ácidos graxos insaturados: ácidos graxos saturados nos fosfolipídios de membrana e o baixo conteúdo de colesterol indicam maior grau de susceptibilidade dos espermatozoides ao choque térmico, estes fatores evidenciam uma estrutura

de membrana espermática menos estável e coesa (White, 1993).

A permeabilidade da membrana sendo alterada por danos na barreira física causados pelo choque térmico permite a entrada aos cátions, levando a um deslocamento de íons, o que modifica as concentrações iônicas nos meios intra e extracelulares (Watson, 1996).

### *2.1.2 Efeito solução*

Vários são os mecanismos que ocasionam estresse osmótico e alterações na membrana plasmática dos espermatozoides, assim como danos na estrutura lipídica, membrana mitocôndrial e sinalização celular (Mayers, 2005). A capacidade da célula espermática em responder aos ajustes de volume é determinada por vários fatores incluindo a composição dos fosfolipídeos de membrana, a permeabilidade à água, temperatura de transição da fase lipídica, atividade da bomba ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, canais de água e canais iônicos.

À temperatura em torno de 5°C, a água intracelular permanece resfriada, mas não cristalizada. A formação de cristais de gelo no meio extracelular ocorre entre as temperaturas de -5°C a -10°C.

O processo de congelamento da água do meio diluidor leva a um aumento da pressão osmótica no meio extracelular não congelado. A primeira resposta da célula a esse estresse osmótico é a saída de água para o meio extracelular. O processo cessa quando a concentração de soluto se torna grande o bastante para prevenir futuras transformações de água em gelo (Watson, 1995). No entanto, a curva de congelamento não pode ser lenta demais, pois acarretaria uma desidratação excessiva e danosa da célula, fenômeno conhecido como efeito solução. O encolhimento excessivo da célula e a desnaturação de macromoléculas são conseqüências da desidratação excessiva e podem levar ao colapso da membrana plasmática (Medeiros, et al., 2002).

Pesquisas têm demonstrado que existem grupos de proteínas encarregados da sinalização celular aos estímulos gerados pelo estresse osmótico. Nas células, estas proteínas são chamadas proteínas mitogênicas ativadas (MAP) que pertencem ao grupo das kinases que são elementos importantes para a transdução de sinais de eventos que ocorrem da superfície celular para o núcleo. As proteínas mitogênicas ativadas têm um papel muito importante na proliferação e diferenciação celular e

essas são ativadas em resposta ao estresse celular (Raingeaud et al., 1995; Volonte et al., 2001).

Vários membros da família das MAP kinases têm sido identificados, incluindo as ERK 40, as quais são kinases que sinalizam a regulação extracelular osmótica e a p38 MAP kinase (Rouse et al., 1994).

O choque osmótico pode ativar a p38 MAP kinase e outras vias dessas kinases nas células dos mamíferos. As ERK são principalmente ativadas pela estimulação dos fatores de crescimento, enquanto as p38 MAP são ativadas pelo estímulo do estresse, incluindo o estresse osmótico (Volonte et al., 2001).

### *2.1.3 Formação de cristais de gelo*

O outro problema que pode ser lesivo a célula espermática, além do efeito solução e do choque térmico, é a formação de grandes cristais de gelo intracelularmente. Isto ocorre se a curva de congelamento for muito rápida, não permitindo a desidratação gradativa da célula. A água cristalizaria em grande quantidade dentro da célula antes mesmo de sua retirada pela diferença de pressão osmótica crescente do meio extracelular. A formação de grandes

cristais de gelo intracelular leva a lesão mecânica das membranas inviabilizando a célula espermática pós-descongelamento. Portanto para evitar os efeitos nocivos da hiperdesidratação celular e os efeitos da formação de cristais de gelo em excesso dentro da célula, é necessário o uso de curvas de congelamento que evitem ao máximo cada efeito nocivo. Portanto, uma curva moderada de congelamento com uma temperatura de descongelamento moderada é indicada dependendo da célula a ser criopreservada (Amann e Pickett, 1987).

Quando as soluções celulares contendo crioprotetores são submetidas a temperaturas de  $-5^{\circ}\text{C}$ , tanto as células como o meio extracelular permanece descongelado. Isto é devido a um super-resfriamento decorrente do abaixamento do ponto de solidificação da solução provocado pela adição do crioprotetor. Normalmente somente ocorre a formação de cristais de gelo no meio extracelular a temperaturas entre  $-5^{\circ}\text{C}$  e  $-15^{\circ}\text{C}$ . Nesta faixa de temperatura as células ainda permanecem descongeladas e estão super resfriadas, Provavelmente porque a membrana plasmática impede o crescimento dos cristais de gelo em direção ao meio intracelular. A água super resfriada do

interior da célula tem um potencial químico maior do que a água do meio extracelular parcialmente congelada e dessa forma a água sai da célula e congela externamente (Mazur, 1984), aumentando assim a viabilidade espermática pós-descongelamento.

## **2.2 Extensores seminais**

Os extensores seminais são meios enriquecidos com diferentes substâncias as quais oferecem um ambiente adequado aos espermatozóides para sua sobrevivência. Várias são as razões consideradas ao escolher o extensor seminal particularmente para o sêmen eqüino (Squires, 1999):

- Permitir um efetivo tratamento antibiótico do sêmen, para minimizar a transmissão de agentes patogênicos sem causar danos aos espermatozóides;
- Prolongar o tempo de sobrevivência dos espermatozóides;
- Proteger os espermatozóides sob condições ambientais desfavoráveis;
- Incrementar ou aumentar o volume da dose inseminante;
- Prover nutrientes básicos ao espermatozóide;

- Possuir uma pressão osmótica compatível (300 a 400 mOsmol);
- Neutralização dos produtos tóxicos produzidos pelo espermatozóide;
- Proteção contra as mudanças da temperatura;
- Prover aos espermatozóides uma estabilização dos sistemas enzimáticos e integridade das membranas (Squires, 1999).

Segundo Silva Filho (1994), os principais componentes dos meios extensores são: substâncias iônicas, tampões, água, macromoléculas, carboidratos, antibióticos, e crioprotetores. As lipoproteínas contidas no leite ou gema de ovo protegem os espermatozóides contra o choque térmico, os substratos, tais como glicose, trealose e rafinose, atuam como fonte de energia e como crioprotetores; os tampões atuam protegendo contra mudanças de pH e os antibióticos como penicilina e estreptomicina, entre outros, retardam ou evitam o crescimento e a multiplicação bacteriana (England 1993, Nelson e Couto, 1994).

Além dos agentes crioprotetores, outros componentes dos meios diluidores

participam diretamente na proteção ao processo do congelamento e descongelamento. Os lipídios, ou mais especificamente, as lipoproteínas, protegem os espermatozóides dos danos causados pelo choque térmico. Pode-se utilizar um diluidor apenas com gema de ovo como fonte de lipoproteína, como o meio Lactose-EDTA-Gema de ovo (Martin et al., 1979), ou uma combinação de gema de ovo e leite, como utilizado no diluidor Institut de la Recherche Agronomique-France (INRA 82), (Vidament et al., 1997).

Watson (1995) destacou a efetiva proteção da gema de ovo aos espermatozóides contra o choque térmico, mas não sendo igualmente efetivo em todas as espécies. Segundo o autor seus efeitos impedem o enrolamento da cauda do espermatozóide, mantendo, com isso, a motilidade. O mesmo autor afirmou ser a fração lipoprotéica de baixa densidade e alto peso molecular, o componente ativo da gema de ovo, agindo somente na superfície celular. Os efeitos do resfriamento e do choque térmico já haviam sido observados por Amann e Pickett, em 1987, quando um forte enrolamento da cauda ocorria na ausência de gema de ovo no meio diluidor. Tentativas para isolar o fator

protetor ativo na gema de ovo foram feitas por Mayer e Lasley (1945), mas somente Kampschmidt et al. (1953), mostraram que uma lipoproteína de baixa densidade da gema de ovo previne o choque térmico. Essa fração lipoprotéica de baixa densidade (LBD), constituída de fosfolípidios, foi identificada como o componente efetivo na proteção do espermatozóide (Parks e Graham, 1992; Weitze e Petzoldt, 1992). Os fosfolípidios, também abundantes no leite, produzem modificações estruturais nas membranas das células, permitindo, desse modo, a adaptação do espermatozóide a baixas temperaturas (Watson, 1985; Varner et al., 1988).

Nos últimos anos, a simplificação das técnicas para obtenção de lipoproteínas de baixa densidade da gema de ovo (Moussa et al., 2002) incrementou o interesse pelo seu uso nos meios diluidores. Foi observada a melhora na motilidade e na habilidade fertilizante no sêmen criopreservado de bovinos, quando as lipoproteínas de baixa densidade foram utilizadas em substituição à gema de ovo total (Moussa et al., 2002). O uso da lipoproteína de baixa densidade na criopreservação do sêmen eqüino é recente, não sendo ainda bem

conhecidos seus efeitos sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento (Juliani et al., 2004).

A associação de leite em pó desnatado e glicose têm sido utilizadas por vários pesquisadores, como o Diluidor de Mínima Contaminação, proposto por Kenney et al. (1975). A glicose difere de outras substâncias usadas na preparação de diluidores pelo fato de não ser ionizada e de ser utilizada pelo espermatozóide para produção de energia. Quando uma solução de glicose é usada em um diluidor, a sobrevivência durante o armazenamento é maior, mas o número de espermatozóides que sobrevivem ao choque térmico não é significativamente maior (Bogart e Mayer, 1950).

Leite ou extensores a base de leite são usados na rotina para a diluição, centrifugação, resfriamento e armazenamento ou estocagem do sêmen eqüino. O fracionamento do leite pelos diferentes métodos (microfiltração, ultrafiltração ou diafiltração, ou congelamento seco) tem permitido a preparação das diferentes frações purificadas. Entre essas, o fosfocaseinato e a  $\beta$ -lactoglobulina foram as substâncias protetoras mais efetivas para preservar a motilidade

durante o resfriamento e estocagem dos espermatozoides eqüinos (Battelier et al., 2001).

Atualmente têm sido utilizados aminoácidos como a glutamina, histidina e glicina betaína no congelamento de sêmen humano, ovino e de garanhões. Em eqüinos a combinação de vários aminoácidos (histidina, prolina, glutamina, betaína) em diferentes concentrações e a sua inclusão no meio extensor INRA 82 acrescido de 2,5% de crioprotetor glicerol e 2% de gema de ovo demonstraram que a glutamina e a prolina são mais eficientes que a histidina e a betaina em aumentar os parâmetros espermáticos após descongelamento, devido a uma melhora significativa do sêmen eqüino (Trimeche, 1999).

Varner et al. (1998) estudaram diferentes curvas de resfriamento utilizando o diluidor de leite e glicose, e obtiveram adequada proteção ao espermatozóide eqüino contra o choque térmico, avaliando como parâmetro de conservação a motilidade espermática. Segundo os autores, os fosfolipídios presentes no leite podem agir promovendo modificações estruturais na membrana plasmática do

espermatozóide, permitindo, com isso, sua adaptação a baixas temperaturas.

Os efeitos positivos dos extensores seminais na atividade antioxidante de sêmen foram demonstrados recentemente por Kankofer et al., (2005). Eles demonstraram os efeitos positivos dos diluentes à base de leite na atividade antioxidante, resultando em um incremento da atividade da glutathione peroxidase, da superóxido desmutase e da catalase. Isso sugere que o plasma seminal tem uma interação positiva com o extensor, resultando em uma melhor proteção da membrana plasmática devido a um incremento na capacidade antioxidante.

Tem-se levantado a hipótese que a adição de antioxidantes nos extensores seminais como o ácido ascórbico (Aurich et al., 1997) ou o piruvato (Bruemmer et al., 2002) pode resultar em uma melhor manutenção da integridade da membrana plasmática (Aurich et al., 1997) e melhor motilidade e fertilidade do espermatozóide eqüino (Bruemmer et al., 2002).

## 2.3 Técnica de Congelamento de Sêmen em Eqüinos

### 2.3.1 Coleta e avaliação do sêmen

Para o processo de congelamento do sêmen no eqüino é necessário realizar uma rotina de coletas diárias durante sete dias para obter um equilíbrio das reservas extragonadais e assim obter um parâmetro mais próximo da produção espermática do garanhão (Jasko, 1994).

As coletas de sêmen são realizadas com o auxílio de uma vagina artificial de fundo fechado modelo Hannover, ou pode ser utilizada uma vagina artificial aberta (Tishner, 1979). A água deve estar com temperatura de 40°C no momento da coleta (Brinsko, et al., 1999). Graham, 1996 sugeriu a colheita apenas da fração do ejaculado rico em espermatozóides, livre de gel, com a utilização da vagina artificial de fundo aberto.

Após a colheita a fração rica em espermatozóides é avaliada quanto às características físicas (motilidade total, motilidade progressiva, vigor, concentração, cor, aspecto). E para a escolha do ejaculado visando o processo de congelamento é necessário que as características seminais estejam dentro

dos parâmetros mínimos requeridos para a espécie eqüina, isto é, motilidade espermática progressiva maior que 50% e concentração maior de 60 milhões de espermatozóides/ml (Jasko, 1994).

### 2.3.2 Centrifugação

A centrifugação dos espermatozóides tem dois objetivos principais: concentrar os espermatozóides e eliminar o plasma seminal (Amann e Pickett, 1987). Têm-se demonstrado em estudos recentes que a centrifugação pode ser crítica para a membrana plasmática dos espermatozóides, pela indução da peroxidação dos lipídeos (Parinaud et al., 1997).

Para a centrifugação, a porção livre de gel do ejaculado é diluída no meio extensor apropriado procurando diluir o sêmen até obter aproximadamente  $50 \times 10^6$  spz / ml. O meio extensor é pré-aquecido a 37°C, e o sêmen diluído é colocado em tubos de 50 ml e centrifugado por 15 min aproximadamente a 400g. Os diluidores utilizados para o processo de centrifugação são: citrato - EDTA, glicose - EDTA e lactose - EDTA, segundo (Mckinnon, 1996).

Graham (1996) propôs uma força gravitacional de 300 a 400g durante oito a quinze minutos. Já Heitland et al., (1996) utilizaram uma força gravitacional de 400g durante um período de quatorze a dezesseis minutos, para uma máxima recuperação dos espermatozoides sem efeitos deletérios. Pesquisas têm relatado a utilização do meio diluidor (Kenney, 1975) na proporção de 50% mais 50% de ringer lactato como meio extensor para centrifugação. Usando-se este diluidor foi observada menor alteração morfológica dos espermatozoides e obteve-se uma taxa de recuperação de 87% de células espermáticas após ressuspensão, centrifugando-se a uma força de 600 g por dez minutos (Dell’acqua Junior e Papa, 2001).

### 2.3.3 Plasma seminal

Um dos fatores que podem influenciar a longevidade da motilidade espermática, como a qualidade da cromatina nuclear após o descongelamento, é a quantidade de nível de plasma seminal (Love et al, 2002). Alguns estudos demonstraram que a proporção de plasma seminal reduz a motilidade espermática, (Brinsko et al., 2000), porém outros estudos demonstraram não haver diferenças na motilidade após o

descongelamento com altos níveis de plasma seminal (Jasko, 1992).

Normalmente o plasma seminal é removido do processo de congelamento deixando aproximadamente de 0-5% de seu volume original. A remoção do plasma seminal é necessária para a sobrevivência da célula durante a criopreservação (Aman e Pickett, 1987). Algumas pesquisas indicam que o plasma seminal possui efeitos benéficos aos espermatozoides humanos e eqüinos criopreservados (Katila et al., 2002). Altas porcentagens de motilidade espermática foram encontradas para espermatozoides humanos congelados em diluidor contendo plasma seminal em volume de 50 – 70% do volume original, comparado as amostras contendo 0-25% de plasma seminal. Similarmente, nos maiores percentuais de motilidade espermática foram encontrados em eqüinos depois do descongelamento de amostras contendo 20% do plasma seminal do volume original comparado ao grupo controle ao qual foi removido 100% do plasma (Katila et al., 2002).

O plasma seminal pode conter componentes que protegem as membranas durante a criopreservação. A composição deste pode variar entre



garanhões. Tal fato pode ser determinante na habilidade dos espermatozoides de um reprodutor em particular, em sobreviver ao processo da criopreservação (Moore et al., 2002).

#### *2.3.4 Diluição com o meio extensor*

Após o processo de centrifugação aspira-se o sobrenadante e o pellets é ressuspendido no meio extensor ideal para o congelamento, na proporção de 1:1, ou próxima desta. Esta pequena diluição inicial é feita para realizar o cálculo da concentração e assim ajustar o volume para obter a concentração espermática por ml desejada. Uma redução de 10% da motilidade espermática pela centrifugação é considerada aceitável (Mckinnon,1996). Várias pesquisas têm sido feitas para determinar a concentração final ideal. Tem-se utilizado concentrações finais que variam de  $25 \times 10^6$  sptz/ml até  $400 \times 10^6$  sptz/ml (Jasko, 1994; Vidament, 1997).

#### *2.3.5 Crioprotetores*

Independente do protocolo ou técnica de congelamento utilizada para o processo da criopreservação é necessário o uso de crioprotetores que possuem a função de proteger as células

e tecidos durante o congelamento e a descongelamento. Tem sido relatado que as propriedades requeridas para um eficiente efeito do crioprotetor são: baixo peso molecular, habilidade para atravessar as membranas das células vivas, alta solubilidade em soluções aquosas eletrolíticas e não ser altamente tóxicos (Alvarenga, 2005).

O glicerol tem sido o crioprotetor mais empregado para a criopreservação de espermatozoides da maioria dos animais domésticos. Smith e Polge (1950) foram os primeiros pesquisadores em relatar o efeito crioprotetor do glicerol. O primeiro congelamento de espermatozoides, e a primeira prenhez reportada com a utilização de sêmen congelado em equino foi em 1957 por Barker e Gandier. Como resultado o glicerol tem sido o crioprotetor mais utilizado na rotina para o processo de congelamento de espermatozoides eqüinos (Vidament, 1997).

Apesar do acima exposto, o uso do glicerol como crioprotetor para o congelamento poderia ser um dos fatores causadores de baixas taxas de motilidade espermática pós-descongelamento como também baixas taxas de fertilidade. O glicerol por si só causa injúrias nas células durante o

processo de congelamento além dos danos produzidos pelas taxas de resfriamento (Pace e Sullivan, 1975; Demick et al., 1976). Foi reportado que o glicerol exerce efeito nocivo na fertilidade tanto no sêmen fresco como no sêmen refrigerado, a toxicidade do glicerol podendo ser o resultado da desnaturação das proteínas, como as actinas (Fahy et al., 1990).

Hammerstedt e Graham (1992) também reportaram outros efeitos deletérios do glicerol nas células, especificamente mudanças no citoplasma, isto devido ao incremento na viscosidade celular pela ação intracelular do glicerol, alterando a polimerização da tubulina, e também as associações de microtúbulos. Outros efeitos adversos como mudança no balanço bioenergético, alteração da membrana plasmática e mudanças no glicocálix também foram relatadas. Outros autores concluem que a verdadeira toxicidade do glicerol é devido ao estresse osmótico já que o glicerol penetra as membranas celulares mais facilmente que outros crioprotetores (Gilmore et al., 1995).

Outros crioprotetores penetrantes têm sido estudados para o congelamento de sêmen. Ashwood e Smith (1987) classificaram os crioprotetores

permeantes dentro de dois grupos álcoois (etilenoglicol, glicerol) e amidas. Tem se sugerido que as amidas possuem peso molecular mais baixo comparado ao glicerol e isto seria favorável para o processo da criopreservação devido a que estas podem induzir menor estresse osmótico (Alvarenga et al., 2005). Testes de fertilidade em eqüinos têm sido desenvolvidos demonstrando a melhora significativa na fertilidade de garanhões mediante o uso de dimetil formamida como crioprotetor em sêmen congelado quando comparado ao uso de glicerol (Medeiros et al., 2003; Moffet et al., 2003).

O uso das amidas como crioprotetores penetrantes nos extensores seminais para o sêmen eqüino leva a um incremento na motilidade espermática pós-descongelamento e melhor preservação da integridade das membranas plasmáticas que o glicerol, além disto, permite o uso de sêmen de cavalos que são considerados maus congeladores de sêmen quando é utilizado o glicerol como crioprotetor (Alvarenga et al., 2005).

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas para determinar qual é a concentração mais adequada do

crioprotetor ao meio diluidor sem produzir efeitos adversos aos espermatozoides. O glicerol foi inicialmente utilizado na concentração de 7-10% (Smith e Polge, 1950). Embora trabalhos demonstrem taxas de fertilidades similares em garanhões com sêmen congelado utilizando-se concentrações de glicerol de 7% a 2% (Graham et al., 1978), a concentração de glicerol mais utilizada atualmente nos meios diluidores é de 2% a 5% (Vidament et al., 2002). Em trabalho recente foi demonstrado uma superioridade nos parâmetros de motilidade espermática, motilidade progressiva, vigor e integridade da membranas plasmáticas após o descongelamento com o uso do glicerol na concentração de 2,5% (Vidament et al. 2005).

Medeiros et al. (2003) demonstraram que as motilidades total e progressiva após o descongelamento melhoram significativamente quando os espermatozoides são congelados na presença de dimetil acetamida comparado com glicerol a 5%, porém, motilidades similares foram encontradas na presença de dimetil formamida e metil formamida a 5%.

### 2.3.6 Envasamento

Muitas formas de envase de sêmen diluído já foram testadas. Inicialmente o sêmen foi congelado em forma de pellets. Estes eram produzidos colocando-se pequenas gotas de sêmen já diluído de 0,1 a 0,2 ml em pequenas depressões em bloco de dióxido de carbono. Os pellets assim formados eram armazenados em containeres que mantêm temperaturas de até -196°C (Merkt et al., 1975). Outros sistemas de envasamento também foram testados como as ampolas de vidro com capacidade para 10ml (Pace e Sullivan, 1975). Este último sistema de envasamento não proporcionou adequadas curvas de congelamento pelo fato do congelamento não ocorrer de forma uniforme em toda coluna líquida por consequência da pequena relação de área de superfície (Graham, 1996).

Atualmente os sistemas de envasamento mais comumente utilizado são as palhetas plásticas com capacidade de 0,5ml com o objetivo de obter um congelamento mais uniforme das amostras (Vidament, 1997).

### 2.3.7 Taxas de resfriamento

Para o sucesso na preservação dos espermatozoides, pelo resfriamento, é necessário uma série de etapas que visam a redução nos danos causados às células e que assegurem longevidade *in vitro* e *in vivo*, ou seja, taxa de diluição adequada, diluidores, substâncias protetoras, taxas lentas de resfriamento (Farstad, 1996) e manutenção em temperatura específica que reduza o metabolismo, minimize os danos na membrana e não desencadeie prematuramente a capacitação e reação acrossômica (Loomis, 1992).

O resfriamento induz mudanças na composição lipídica e na organização da bicamada. Quando a temperatura é reduzida, a movimentação lateral dos fosfolípidios se torna mais restrita, exibindo uma transição da fase fluida para gel com formação de arranjos hexagonais (Watson, 1996).

Alterações físicas e químicas das membranas celulares, causadas pelo resfriamento, podem ser irreversíveis tais como a diminuição da fluidez e aumento na permeabilidade da membrana, danos ao acrossoma, liberação de enzimas e fosfolípidios, redução na atividade metabólica e no

consumo de ATP. Todas estas conseqüências podem comprometer parcial ou totalmente a fertilidade (Weitze e Petzoldt, 1992; Farstad, 1996).

Segundo Amann e Pickett (1987) reduções na temperatura abaixo dos 37°C e, especialmente dos 20°C, iniciam alterações na natureza biofísica do espermatozoide equino. Estes pesquisadores concluíram que, para o sucesso de um processo de preservação do sêmen em baixas temperaturas uma série de complexas interações entre diluidor, taxas de resfriamento e temperatura de armazenamento se faz necessário.

Pesquisas têm relatado que as taxas de resfriamento podem ser divididas dentro de três categorias: lentas (<0,33°C/min); médias (0,33°C/min a 1,0°C/min) e rápidas (>1,0°C/min) (Douglas e Hamilton et al., 1984).

Trabalhos têm sido desenvolvidos para mostrar a influência das taxas de resfriamento. Quatro amostras de sêmen equino foram diluídas e distribuídas nos seguintes tratamentos: imersão direta em água a 5,0°C, resfriamento a -1,0°C/min, a -0,5°C/min ou a -0,2°C/min. A motilidade espermática

foi estimada em diferentes momentos e, após trinta e seis horas. Os resultados demonstraram que as três taxas de resfriamento foram menos danosas do que a imersão direta em água a 5°C (Province et al., 1985).

Os efeitos das taxas de resfriamento sobre a motilidade espermática eqüina também foram estudados por Varner et al. (1988). O sêmen foi diluído em extensor de leite desnatado-glicose e foi submetido a três curvas de resfriamento distintas: 1) -0,3°C/min (taxa lenta de resfriamento); 2) -0,9°C/min (taxa moderada); 3) -1,3°C/min (taxa rápida).

O tempo gasto para as amostras atingirem a temperatura final de armazenamento de 4° foi de 7,5; 2,25 e 0,75 hora, respectivamente. Estes pesquisadores concluíram que a amostra, submetida a uma taxa de resfriamento lenta (-0,3°C/min), conservou o parâmetro de motilidade espermática superior durante o experimento quando comparada com as taxas moderada e rápida que resultaram em quedas semelhantes na motilidade.

Amann e Graham (1993) relataram que, para maximizar a manutenção da capacidade fertilizante da célula espermática eqüina, deveria ser feita uma diluição em pelo menos três partes de diluidor apropriado e, então,

resfriado em uma taxa de -0,05°C/min entre 18°C e 8°C.

Pickett (1993), em estudos feitos avaliando as características de motilidade do espermatozóide eqüino, concluiu que o sêmen pode ser rapidamente resfriado de 37°C a 20°C, mas deve ser resfriado em taxas menores ou iguais a 0,1°C/min, preferencialmente a -0,05°C/min de 20°C a 5°C para que haja a manutenção da fertilidade.

### 2.3.8 Congelamento

Até o momento os protocolos de congelamento não têm estabelecido a curva ideal para o processo de congelamento e isto devido à composição do meio diluidor, adição do crioprotetor, concentração do crioprotetor, e taxas de resfriamento, já que deve existir, para o sucesso no processo de congelamento, uma boa interação entre estes fatores (Heitland, 1996). Na maioria dos protocolos atualmente disponíveis para o congelamento é utilizada uma curva de congelamento rápida de -60°C/min e esta é obtida pela exposição das palhetas horizontalmente, 3 cm acima do vapor de nitrogênio (Amann e Pickett, 1987).

Em estudos feitos por Cristanelli et al., 1985 não houve diferenças significativas nas percentagens de motilidade progressiva nos espermatozoides eqüinos congelados no vapor de nitrogênio a altura de 4 cm quando comparados com congelamento em máquina computadorizada utilizando diferentes taxas de congelamento. As curvas em máquina computadorizada utilizadas foram de -10°C/min, da temperatura de 20°C até -15°C; e outra curva de -15°C/min de -15°C até -120°C, quando as palhetas eram mergulhadas no nitrogênio líquido.

Além disto, tem se utilizado também máquinas computarizadas com curvas de congelamento programáveis com álcool e especificamente etanol visando uma melhora na definição das curvas de congelamento.

### 2.3.9 Descongelamento

Segundo Amann e Pickett, (1987) os principais fatores a considerar no momento do descongelamento são: tipo de envase utilizado, uniformidade de descongelamento em relação à condutividade de calor, espessura da parede das palhetas, e a temperatura da água do banho-maria. Estes

pesquisadores concluíram que o descongelamento de amostras contidas em palhetas com capacidade para 0,5ml, deve ser feito à temperatura de 37°C por 30 segundos levando a uma curva de aquecimento de 700°C/min.

Já Holt et al., (2000) sugere que para o descongelamento de amostras de sêmen testando diferentes curvas de aquecimento é recomendável utilizar temperaturas relativamente altas de banho-maria 60°C e 70°C durante sete segundos.

Em estudos conduzidos para avaliar diferentes tipos de envasamentos e temperaturas de descongelamento mais adequadas, foi concluído que para o tipo de envasamento de palhetas com capacidade para um volume de 0,5 e de 0,25 ml e macrotubos de 4ml respectivamente, a temperatura que proporcionou melhores parâmetros espermáticos como motilidade progressiva, em análises computarizadas foi 65°C por 6 segundos (Dell'aqua júnior e Papa, 2001).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Animais

Foram utilizados seis garanhões da raça Mangalarga Marchador, de fertilidade comprovada, com idade variando entre 4 a 8 anos, pertencentes a um mesmo haras, submetidos a iguais condições de criação. Os animais foram selecionados de acordo com exames clínicos andrológicos e espermogramas. Logo após a coleta foi feita a avaliação dos parâmetros espermáticos como motilidade total, motilidade progressiva, vigor, concentração e morfologia, os quais se encontravam dentro dos padrões estipulados para a espécie, de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Após a seleção, o sêmen dos animais foi coletado diariamente durante sete dias até a estabilização das reservas extragonadais.

### **3.2 Coleta de sêmen**

Dois dias após o equilíbrio das reservas extragonadais foram feitas as coletas de sêmen para o congelamento. O sêmen foi coletado utilizando o método da vagina artificial de fundo fechado (modelo Hannover), utilizando como manequim uma égua contida em cio natural ou induzido. Posteriormente, o sêmen foi filtrado e a porção livre de gel foi avaliada quanto a suas características físicas e pH.

### **3.3 Avaliação espermática pré-congelamento**

A avaliação microscópica consistiu na determinação da motilidade total, motilidade progressiva, vigor e concentração. Somente foram utilizados para congelamento, ejaculados que apresentavam motilidade espermática progressiva, igual ou superior a 60% e concentração igual ou maior a 60 milhões de espermatozoides por ml (Jasko, 1994).

### **3.4 Processo de congelamento e descongelamento do sêmen**

Imediatamente após avaliação das motilidades e do vigor, foi feita a diluição seminal 1:1 com o diluidor base INRA 82 (Palmer, 1984) sem crioprotetor (anexo 1), previamente aquecido em banho-maria à temperatura de 37°C e esperou-se um tempo de equilíbrio de dez minutos. O sêmen foi aliquotado em três tubos com um mesmo volume para ser submetido ao processo de centrifugação a 400g por doze minutos. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso usando-se o meio diluidor base INRA 82 sem crioprotetor para completar um volume inicial de 2ml. A diluição final foi realizada para

obter-se uma concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/ml. O volume do crioprotetor dimetil formamida a ser adicionado foi calculado de modo a obter uma concentração final de 5%.

O sêmen pós-diluição final e adição do crioprotetor foi envasado em palhetas de 0,5 ml devidamente identificadas segundo os tratamentos e seladas com massa de modelar atóxica.

### **3.5 Tratamentos e curvas de congelamento**

Foram testados três tempos de adição do crioprotetor dimetil formamida (DMF), e três curvas de congelamento (Anexo 4), utilizando-se como meio diluidor base o meio INRA 82 modificado adicionando-se 5% de dimetil formamida da seguinte forma:

TEMPO 1 : INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada um minuto no tempo de dez minutos;

TEMPO 2 : INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada dois minutos no tempo de vinte minutos;

TEMPO 3 : INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada três minutos no tempo de trinta minutos;

Todas as amostras foram mantidas em temperatura ambiente desde o início do procedimento até adição do crioprotetor por um período médio de uma hora e oito minutos. Em seguida, o resfriamento lento até 5°C prévio ao congelamento foi realizado utilizando-se uma taxa de  $-0,25^\circ\text{C}/\text{min}$ . em máquina computadorizada TK 3000 da Nutricell modelo 2004. Os procedimentos de equilíbrio e congelamento utilizados foram os seguintes:

A) Sem tempo de equilíbrio adicional a 5°C e congelamento imediato a 4cm acima do nível de nitrogênio líquido por quinze minutos, e posterior submersão das amostras no nitrogênio líquido.

B) Com tempo de equilíbrio adicional a 5°C de quarenta e cinco minutos e congelamento a 4cm acima do nível de nitrogênio líquido por quinze minutos, e posterior submersão das amostras no nitrogênio líquido.

C) Com tempo de equilíbrio adicional a 5°C de quarenta e cinco minutos e congelamento computadorizado a uma taxa de  $-10^\circ\text{C}/\text{min}$  por quinze minutos ate -



127°C, e posterior submersão das amostras no nitrogênio líquido.

Após o congelamento, as palhetas foram mergulhadas e estocadas em botijão de nitrogênio líquido a -196°C até a avaliação pós-descongelamento (Jasko, 1994).

As amostras foram descongeladas a 52°C por dez segundos, seguidos de imersão em banho-maria a 37°C por trinta segundos.

### **3.6 Avaliação da osmolaridade dos meios diluidores**

Os meios diluidores de centrifugação, rediluição, e congelamento foram avaliados quanto à osmolaridade. A osmolaridade foi determinada pelo osmômetro de precisão (VAPRO - Vapor Pressure Osmometer, model 5520 - WESCOR - Utah, USA).

A osmolaridade foi de 310,6 mOsmol/L para os meios de centrifugação e rediluição, e para o meio de congelamento após a adição do crioprotetor foi de 1038 mOsmol/L .

### **3.7 Métodos de avaliação espermática pós-descongelamento**

#### *3.7.1 Motilidade total e progressiva*

A análise do sêmen foi realizada em microscopia óptica, com aumento de 400 vezes, utilizando-se 5 µl de sêmen, colocados entre lâmina e lamínula, previamente aquecida a 37°C. A motilidade progressiva foi determinada pela avaliação da porcentagem de células espermáticas que apresentarem movimento retilíneo e movimento circular aberto, pela avaliação de, no mínimo, seis campos.

#### *3.7.2 Morfologia espermática*

A morfologia espermática foi avaliada em amostras de sêmen preservada em solução de formol salina tamponada (Barth e Oko, 19890). A avaliação foi realizada em preparações úmidas entre lâmina e lamínula em microscopia de contraste de fase (100 células por amostra) no aumento de 1000 vezes de acordo com Nie e Wenzel (2001).

As alterações nas formas dos espermatozóides foram agrupadas de acordo com a localização das mesmas: defeitos de cabeça, peça intermediária e peça principal/peça terminal. A presença de gota citoplasmática,

proximal e distal foi computada separadamente. Cada célula espermática foi classificada em apenas uma categoria de defeitos.

### 3.7.3 *Teste de termoresistência*

As amostras de sêmen foram submetidas ao teste de longevidade e duração da motilidade dos espermatozoides imediatamente após o descongelamento, incubando as mesmas a 37°C. As avaliações da motilidade total, progressiva e vigor foram realizados a intervalos de tempo de trinta minutos até o decréscimo da motilidade abaixo de 5%.

### 3.7.4 *Avaliação da integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides*

O teste hiposmótico (HO) foi realizado misturando 100 µl de sêmen em 1,0 ml de solução de sacarose a 100 mOsmol/L, (Anexo 2) ambos a 37°C, seguido de incubação em banho-maria a 37°C por trinta minutos. Após este período, as amostras foram fixadas em 0,5 ml de solução de formol salina tamponada, para posterior análise em microscopia de contraste de fase. Foram avaliadas 100 células por amostras, com aumento de 1250 vezes. O índice da

integridade da membrana plasmática da cauda dos espermatozoides foi calculado seguindo a fórmula: HO (%) = (% de alterações na região da cauda após o teste HO) – (% de alterações na região da cauda dos espermatozoides do sêmen *in natura* antes do teste HO), (Melo e Henry, 1999).

### 3.7.5 *Avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática e acrossomal da cabeça dos espermatozoides*

Foi realizada seguindo a técnica descrita por Harrison e Vickers (1990) com modificações citadas por Zúccari (1998), na qual dois fluorocromos foram utilizados, o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídeo (IP).

As soluções de diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídeo foram preservadas e estocadas ao abrigo de luz. Estas soluções foram separadas e divididas em volumes iguais em tubos ependorfes e selados revestidos de papel alumínio e mantidos no freezer à temperatura de -20°C (Anexo 3).

Prepararam-se soluções de formol e citrato de sódio estocadas sob

refrigeração, a 5°C, para uso no período máximo de dois dias (Anexo 3).

A solução trabalho foi preparada no dia do descongelamento do sêmen, ao abrigo de luz. Após o descongelamento das palhetas, as amostras para avaliação foram preparadas adicionando 10 µl de sêmen em 40 µl da solução trabalho (Anexo 3). As amostras foram incubadas à temperatura de 37°C por oito minutos e avaliadas imediatamente ao abrigo da luz. Foram avaliadas 300 células por amostra.

A avaliação das lâminas foi realizada em microscópio de epifluorescência Axiovert - zeiss a com filtros de 480 a 610 nm de emissão, com aumento de 400X. A integridade das membranas plasmática e acrossomal foram interpretadas de acordo com a coloração apresentada pelos espermatozóides:

a) Espermatozóides íntegros: espermatozóides completamente corados de verde fluorescente em toda a sua superfície pelo diacetato de carboxifluoresceína;

b) Espermatozóides lesados: espermatozóides com membrana plasmática e acrossomal lesadas mostrando núcleo corado com vermelho pelo iodeto de propídeo;

c) Espermatozóides semilesados: espermatozóides com núcleo corado de vermelho pelo iodeto de propídeo e fluorescência verde no acrossoma pelo diacetato de carboxifluoresceína.

### **3.8 Análise estatística**

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, considerando se o ganhão como o bloco, em arranjo fatorial 3 x 3 com seis repetições por tratamento. Os dados quantitativos (teste hiposmótico, integridade estrutural das membranas plasmáticas e integridade da membrana acrossomal dos espermatozóides) foram submetidos a análise para verificação da normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cochran e Bartlett), sendo usado o programa SAEG versão 8.0. As médias foram comparadas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Duncan. Os dados qualitativos (motilidade total, motilidade progressiva, vigor, e teste de termo Resistência) foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal - wallis, além disso, foram feitas correlações pelo método de Pearson e Spearman entre as variáveis estudadas.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados referentes às características físicas como motilidade

total, motilidade progressiva, vigor e espermatozóides reativos ao teste hiposmótico são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1 - Características físicas do sêmen a fresco e reatividade ao teste hiposmótico de seis garanhões, imediatamente pós-colheita.**

<b>Garanhão</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Média ± Dp</b>
Motilidade Total (%)	70	75	80	75	70	70	73,3 ± 3,72
Motilidade progressiva (%)	65	70	75	70	65	65	68,3 ± 3,72
Vigor (escala de 1 a 5)	3,5	3,5	4,0	3,5	3,5	3,5	3,58 ± 0,18
<b>Porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico</b>							
	51	54	66	49	49	68	56,16±8,61

Dp: Desvio padrão.

A porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico, com membrana íntegra funcional foi em média de 56,16% variando de 49% a 68%. Os valores de motilidade espermática total, progressiva e vigor após o descongelamento estão resumidos nas Tabelas 2, 3, e 4. Foi

observada queda significativa ( $P < 0,05$ ) nos valores da motilidade total e progressiva entre o sêmen fresco e após o descongelamento. Em relação ao vigor espermático não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre o sêmen a fresco e o sêmen descongelado.

**Tabela 2 - Porcentagem de motilidade total de espermatozóides eqüinos pós-descongelamento nos diferentes tempos de adição do crioprotetor e nas diferentes curvas.**

<b>Curvas</b>	<b>Tempo de adição do crioprotetor (minutos)</b>		
	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>30</b>
1	47,5 ± 7,58	44,17 ± 7,36	40,83 ± 5,85
2	42,5 ± 7,58	39,17 ± 3,76	41,67 ± 7,53
3	39,17 ± 3,76	42,50 ± 7,58	42,50 ± 5,24

1: Sem tempo de equilíbrio adicional a 5°C seguido de congelamento; 2: Com tempo de equilíbrio adicional a 5°C de 45 minutos seguido de congelamento; 3: Com tempo de equilíbrio adicional a 5°C de 45 minutos e congelamento computadorizado. TEMPO 10: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 1 minuto no tempo de dez minutos; TEMPO 20: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 2 minutos no tempo de 20 minutos TEMPO 30: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 30 minutos no tempo de 30 minutos.

O tempo de adição de dez minutos apresentou maior porcentagens de espermatozóides com motilidade total

(47,5% ± 7,58), apesar de não apresentar diferença significativa entre os outros dois tempos de adição de vinte

e trinta minutos. Foi observado para a curva de congelamento 1 uma maior porcentagem de motilidade total ( $47,5 \pm 7,58$ ), a qual não foi observado para as curvas 2 e 3 que apresentaram as menores porcentagens ( $39,17 \pm 3,76$ ) respectivamente.

A motilidade progressiva pós-descongelamento variou de  $33,33\% \pm 4,08$  a  $40,83\% \pm 6,45$  dependendo do tempo de adição do crioprotetor e das curvas de resfriamento e congelamento utilizadas. Esta motilidade progressiva é mais facilmente visualizada na Figura 1. Observa-se que o ganhão número dois apresentou melhores resultados nas motilidades total e progressiva ao

contrário do ganhão número seis, em que foram observados valores mais baixos nas motilidades total e progressiva após o descongelamento.

O tempo de adição de dez minutos apresentou maiores porcentagens de espermatozoides com motilidade progressiva ( $40,83 \pm 6,45$ ), apesar de não apresentar diferença significativa entre os outros dois tempos de adição de vinte e trinta minutos. Foi observado para a curva de congelamento 1 uma maior porcentagem de motilidade progressiva ( $40,83 \pm 6,45$ ), a qual não foi observado para a curva 3 que apresentou as menores porcentagens ( $33,33 \pm 4,08$ ).

**Tabela 3 - Porcentagem de motilidade progressiva de espermatozoides equinos pós-descongelamento nos diferentes tempos de adiçao do crioprotetor e nas diferentes curvas.**

Curvas	Tempo de adiçao do crioprotetor (minutos)		
	10	20	30
1	40,83 ± 6,45	38,33 ± 8,76	35,83 ± 5,85
2	37,50 ± 7,58	34,17 ± 3,76	36,67 ± 7,53
3	33,33 ± 4,08	37,50 ± 7,58	36,67 ± 6,06

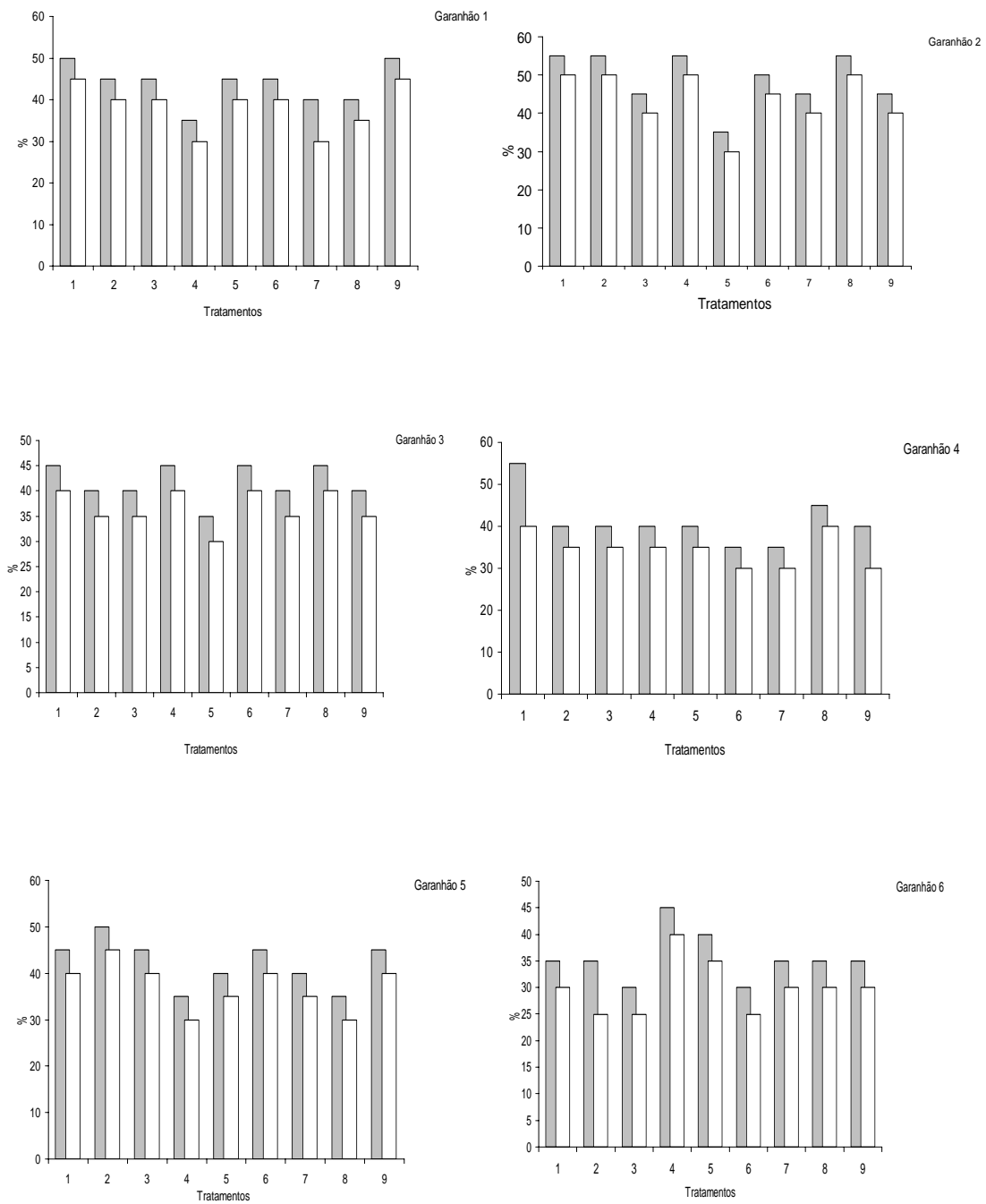
1: Sem tempo de equilibrio adicional a 5°C seguido de congelamento; 2: Com tempo de equilibrio adicional a 5°C de 45 minutos seguido de congelamento; 3: Com tempo de equilibrio adicional a 5°C de 45 minutos e congelamento computadorizado. TEMPO 10: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a decima parte do mesmo a cada 1 minutos no tempo de dez minutos; TEMPO 20: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a decima parte do mesmo a cada 2 minutos no tempo de 20 minutos TEMPO 3 : INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a decima parte do mesmo a cada 30 minutos no tempo de 30 minutos;

**Tabela 4 - Vigor espermatico pós-descongelamento de espermatozoides equinos nos diferentes tempos de adiçao do crioprotetor e nas diferentes curvas.**

Curvas	Tempo de adiçao do crioprotetor (minutos)		
	10	20	30
1	3,08 ± 0,20	3,08 ± 0,20	3,08 ± 0,20
2	3,08 ± 0,20	2,83 ± 0,41	2,75 ± 0,88
3	2,92 ± 0,20	3,08 ± 0,20	3,08 ± 0,20

1: Sem tempo de equilibrio adicional a 5°C seguido de congelamento; 2: Com tempo de equilibrio adicional a 5°C de 45 minutos seguido de congelamento; 3: Com tempo de equilibrio adicional a 5°C de 45 minutos e congelamento computadorizado. TEMPO 10: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a decima parte do mesmo a cada 1 minutos no tempo de dez minutos; TEMPO 20: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a decima parte do mesmo a cada 2 minutos no tempo de 20 minutos TEMPO 3 : INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a decima parte do mesmo a cada 30 minutos no tempo de 30 minutos;

**Figura-1 Motilidades total e progressiva após o descongelamento de espermatozóides eqüinos congelados com três tempos de adição do crioprotetor e diferentes curvas de congelamento.**



**T:** Tratamentos; **T 1:** curva 1 + tempo 1; **T 2:** curva 1+ tempo 2; **T 3:** curva 1+ tempo 3; **T 4:** curva 2 + tempo 1 **T 5:** curva 2 + tempo 2; **T 6:** curva 2 + tempo 3; **T 7:** curva 3 + tempo 1 **T 8:** curva 3 + tempo 2; **T 9:** curva 3 + tempo 3%.

■ Motilidade total      □ Motilidade progressiva

Os resultados da avaliação das membranas plasmáticas e acrossomal, por meio das sondas fluorescentes estão discriminados nas Tabelas 5, 6 e 7. Os valores da integridade da membrana plasmática e acrossomal variaram entre  $44,33\% \pm 12,25$  a  $50,50\% \pm 4,10$ ; para o tempo de adição de trinta minutos foi observado uma maior porcentagem de espermatozóides com membranas íntegras; já para o tempo de vinte minutos observou-se menor porcentagem de células com membranas

íntegras, e para a curva de congelamento 2 utilizando-se a máquina computadorizada foi observado maior porcentagem de espermatozóides com membranas íntegras; o qual não foi observado para a curva de congelamento 1, que apresentou a porcentagem numericamente menor de espermatozóides íntegros ( $44,33 \pm 12,25$ ), mesmo não sendo encontrada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tempos de adição e as curvas de resfriamento/congelamento.

**Tabela 5 - Porcentagem de espermatozóides íntegros pós-descongelamento nos diferentes tempos de adição do crioprotetor e nas diferentes curvas.**

Curvas	Tempo de adição do crioprotetor (minutos)		
	10	20	30
1	$47,67 \pm 10,52$	$45,58 \pm 7,39$	$44,33 \pm 12,25$
2	$48,08 \pm 5,42$	$46,75 \pm 10,91$	$50,50 \pm 4,10$
3	$46,08 \pm 10,22$	$47,33 \pm 5,51$	$46,58 \pm 12,64$

1: Sem tempo de equilíbrio adicional a 5°C seguido de congelamento; 2: Com tempo de equilíbrio adicional a 5°C de 45 minutos seguido de congelamento; 3: Com tempo de equilíbrio adicional a 5°C de 45 minutos e congelamento computadorizado. TEMPO 10: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 1 minutos no tempo de dez minutos; TEMPO 20: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 2 minutos no tempo de 20 minutos TEMPO 3 : INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 30 minutos no tempo de 30 minutos;

**Tabela 6 - Porcentagem de espermatozóides semi lesados pós-descongelamento nos diferentes tempos de adição do crioprotetor e nas diferentes curvas.**

Curvas	Tempo de adição do crioprotetor (minutos)		
	10	20	30
1	$24,92 \pm 13,44$	$17,18 \pm 10,96$	$22,25 \pm 11,83$
2	$17,67 \pm 6,07$	$18,75 \pm 9,04$	$16,33 \pm 11,22$
3	$19,83 \pm 11,48$	$16,00 \pm 10,04$	$16,83 \pm 9,95$

1: Sem tempo de equilíbrio adicional a 5°C seguido de congelamento; 2: Com tempo de equilíbrio adicional a 5°C de 45 minutos seguido de congelamento; 3: Com tempo de equilíbrio adicional a 5°C de 45 minutos e congelamento computadorizado. TEMPO 10: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 1 minutos no tempo de dez minutos; TEMPO 20: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 2 minutos no tempo de 20 minutos TEMPO 3 : INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 30 minutos no tempo de 30 minutos;



Para os espermatozoides com membranas plasmáticas e acrossomais semi lesadas pós-descongelamento os valores variaram entre  $16,00\% \pm 10,04$  e  $24,92 \pm 13,44$ ; para o tempo de adição de dez minutos foi observada a maior porcentagem de espermatozoides com membranas semi lesadas; já para o tempo de vinte minutos observou-se a menor porcentagem de células com membranas semi lesadas; e para a curva

de congelamento 1 foi observada maior porcentagem de espermatozoides com membranas semi lesadas; o qual não foi observado para a curva de congelamento 3 que apresentou a porcentagem menor, mesmo não sendo encontrada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre todos os tempos de adição e as curvas de resfriamento/congelamento.

**Tabela 7 - Porcentagem de espermatozoides lesados pós-descongelamento nos diferentes tempos de adição do crioprotetor e nas diferentes curvas.**

Curvas	Tempo de adição do crioprotetor (minutos)		
	10	20	30
1	$27,50 \pm 15,69$	$36,97 \pm 15,48$	$33,17 \pm 8,45$
2	$32,50 \pm 12,24$	$34,42 \pm 18,25$	$33,17 \pm 13,64$
3	$33,83 \pm 18,49$	$36,58 \pm 12,45$	$36,75 \pm 21,48$

1: Sem tempo de equilíbrio adicional a  $5^{\circ}\text{C}$  seguido de congelamento; 2: Com tempo de equilíbrio adicional a  $5^{\circ}\text{C}$  de 45 minutos seguido de congelamento; 3: Com tempo de equilíbrio adicional a  $5^{\circ}\text{C}$  de 45 minutos e congelamento computadorizado. TEMPO 10: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 1 minutos no tempo de dez minutos; TEMPO 20: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 2 minutos no tempo de 20 minutos TEMPO 3 : INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 30 minutos no tempo de 30 minutos;

Para os espermatozoides com membranas plasmáticas e acrossomais lesadas pós-descongelamento os valores variaram entre  $27,50\% \pm 15,69$  e  $36,97\% \pm 15,48$ ; para o tempo de adição de vinte minutos foi observada a maior porcentagem de espermatozoides com membranas lesadas; já para o tempo de dez minutos observou-se uma menor porcentagem de células com membranas lesadas, e para a curva de congelamento 1 foi observado uma maior porcentagem de espermatozoides com

membranas lesadas; o qual não foi observado para a curva de congelamento 2 que apresentou menor porcentagem, mesmo não sendo encontrada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tempos de adição e as curvas de resfriamento/congelamento.

A porcentagem de células espermáticas reativas ao teste hiposmótico após o descongelamento está representada na Tabela 8. Os valores de integridade funcional da membrana plasmática da

cauda pós-descongelamento variaram entre  $40,67\% \pm 6,77$  e  $34,17\% \pm 5,94$  considerando todos os tratamentos; para o tempo de adição de vinte minutos foi observada uma maior porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas funcionais, já para o tempo de trinta minutos observou-se um menor valor percentual de células com membranas plasmáticas funcionais. Para as curvas de congelamento, na curva 3 foi observado maior porcentagem de espermatozoides com membranas plasmáticas funcionais ( $P < 0,05$ ); o qual não foi observado para a curva de congelamento 1 que apresentou a menor porcentagem.

Não foi encontrada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tempos de adição do crioprotetor e as diferentes curvas de resfriamento/congelamento.

Os resultados deste trabalho mostram que os principais tipos de reações encontradas nas células espermáticas submetidas ao teste hiposmótico foram reflexão proximal e distal de peça intermediária, peça terminal enrolada, reflexão de peça intermediária com peça terminal enrolada. O ganhão um apresentou o maior número de células reativas ao teste hiposmótico e o ganhão seis apresentou o menor número de células reativas ao teste hiposmótico após o descongelamento.

**Tabela 8 - Porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico pós-descongelamento.**

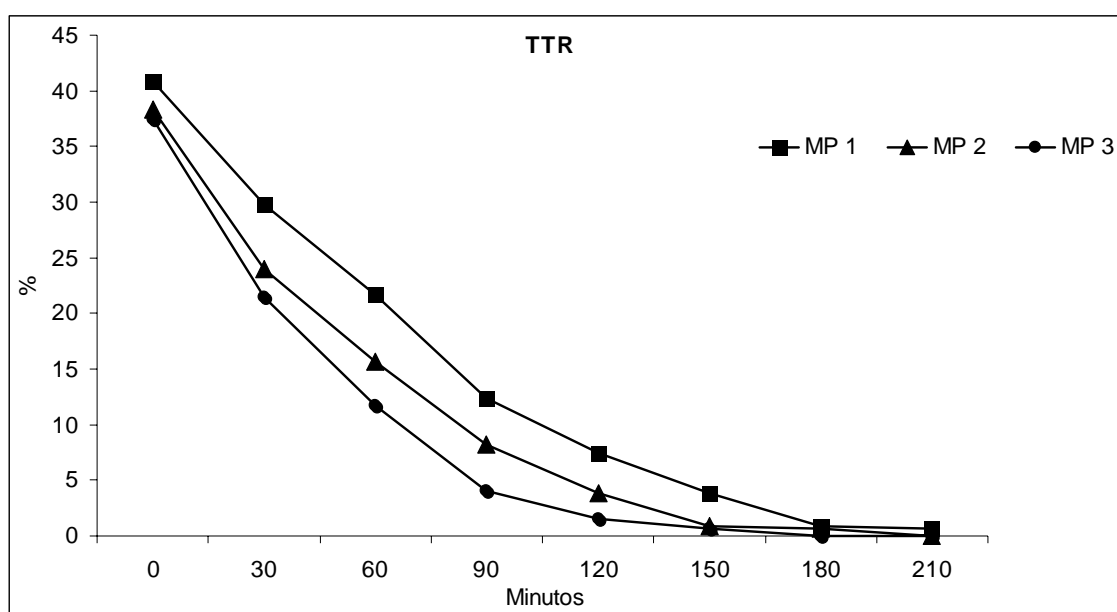
Curvas	Tempo de adição do crioprotetor (minutos)		
	10	20	30
1	$36,83 \pm 4,22$	$38,67 \pm 7,00$	$37,00 \pm 4,00$
2	$39,17 \pm 5,49$	$38,50 \pm 5,82$	$34,17 \pm 5,94$
3	$38,50 \pm 4,76$	$40,67 \pm 6,77$	$39,17 \pm 4,67$

1: Sem tempo de equilíbrio adicional a  $5^{\circ}\text{C}$  seguido de congelamento; 2: Com tempo de equilíbrio adicional a  $5^{\circ}\text{C}$  de 45 minutos seguido de congelamento; 3: Com tempo de equilíbrio adicional a  $5^{\circ}\text{C}$  de 45 minutos e congelamento computadorizado. TEMPO 10: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 1 minuto no tempo de dez minutos; TEMPO 20: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 2 minutos no tempo de 20 minutos TEMPO 30: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 30 minutos no tempo de 30 minutos;

Foi realizado o teste de termorresistência para avaliar o grau de longevidade da motilidade espermática após o descongelamento. As Figuras 2, 3 e 4 representam as médias de motilidade total, progressiva e vigor para o teste de termorresistência. Não foi observada uma diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tempos

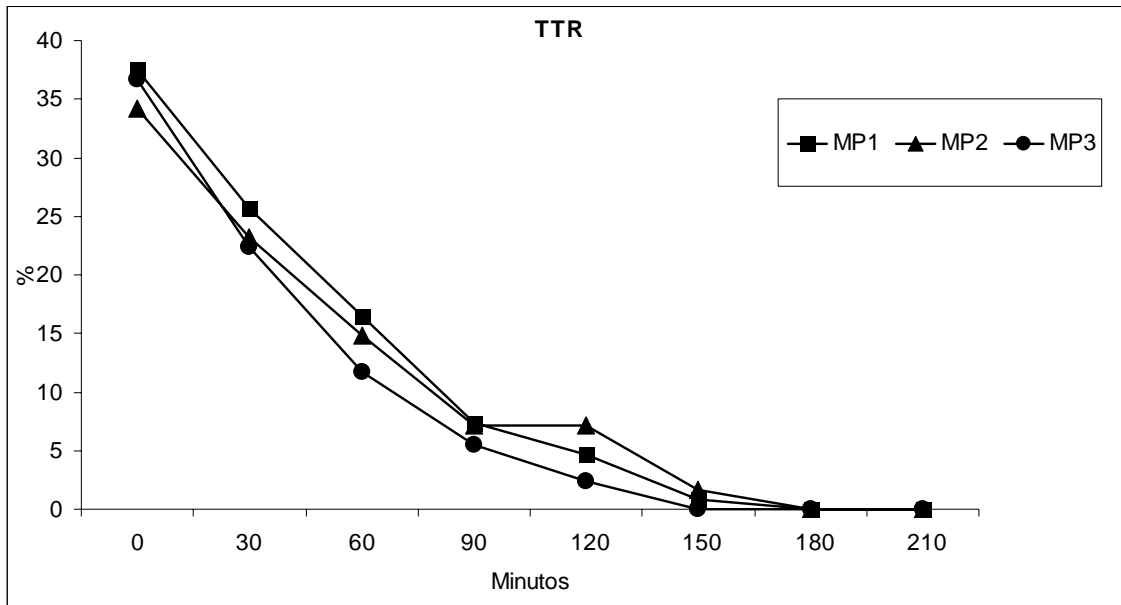
de adição do crioprotetor e as diferentes curvas de resfriamento/congelamento em cada tempo de observação. Para o garanhão um observou-se uma maior longevidade dos espermatozoides, comparado com o garanhão seis, o qual teve uma menor longevidade dos espermatozoides.

**Figura – 2 Motilidades progressivas médias pós-descongelamento de espermatozoides eqüinos submetidos à teste de termorresistência na curva de congelamento número 1 nos diferentes tempos de adição do crioprotetor.**



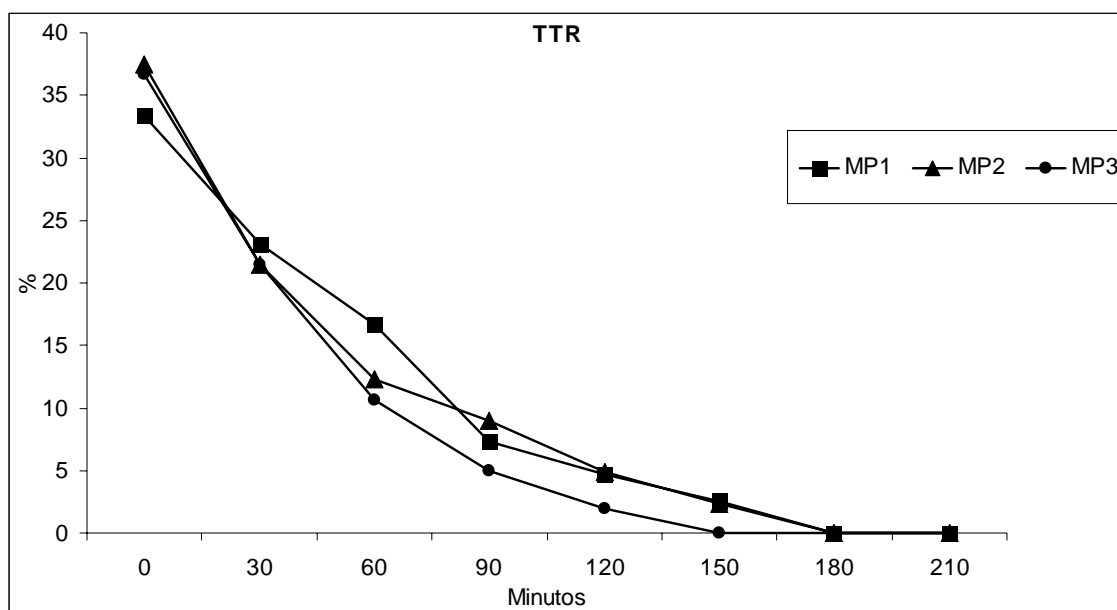
—■— MP 1 TEMPO 1: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 1 minutos no tempo de dez minutos; —▲— MP 2 TEMPO 2: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 2 minutos no tempo de 20 minutos. —●— MP 3 TEMPO 3 : INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 30 minutos no tempo de 30 minutos ; Curva de congelamento 1: Sem tempo de equilíbrio adicional a 5°C seguido de congelamento.

**Figura – 3 Motilidades progressivas médias pós-descongelamento de espermatozóides eqüinos submetidos à teste de termorresistência na curva de congelamento número 2 nos diferentes tempos de adição do crioprotetor.**



—■— MP 1 TEMPO 1: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 1 minutos no tempo de dez minutos; —▲— MP 2 TEMPO 2: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 2 minutos no tempo de 20 minutos. —●— MP 3 TEMPO 3 : INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 30 minutos no tempo de 30 minutos ; Curva de congelamento 2 : Com tempo de equilíbrio adicional a 5°C de 45 minutos seguido de congelamento.

**Figura – 4 Motilidades progressivas médias pós-descongelamento de espermatozóides eqüinos submetidos à teste de termorresistência na curva de congelamento número 3 nos diferentes tempos de adição do crioprotetor.**



—■— MP 1 TEMPO 1: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 1 minutos no tempo de dez minutos; —▲— MP 2 TEMPO 2: INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 2 minutos no tempo de 20 minutos. —●— MP 3 TEMPO 3 : INRA 82 + 2% gema de ovo + 5% DMF adicionando-se a décima parte do mesmo a cada 30 minutos no tempo de 30 minutos ; Curva de congelamento 3 : Com tempo de equilíbrio adicional a 5°C de 45 minutos e congelamento computadorizado.

Os coeficientes de correlação entre as variáveis motilidade total, progressiva, vigor, porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática funcionalmente ativa e porcentagem de espermatozóides com membranas plasmáticas e acrossomal íntegras foram avaliados após o descongelamento. Correlações positivas e de baixa magnitude foram observadas entre a porcentagem de células reativas ao teste

hiposmótico e motilidade total e motilidade progressiva. Correlações negativas e de baixa magnitude foram encontradas entre a porcentagem de espermatozóides com membranas plasmáticas e acrossomal íntegra e motilidades total, progressiva, e vigor, e entre o teste hiposmótico e a porcentagem de espermatozóides com membranas plasmáticas e acrossomal íntegras.

**Tabela 9 – Correlações entre os parâmetros espermáticos avaliados imediatamente após o descongelamento.**

	<b>Ho%</b>	<b>Íntegros</b>	<b>Semi lesados</b>	<b>Lesados</b>
<b>MP (%)</b>	0,4140 P = (3,0139)	- 0,1638 P = (-1,1933)	-0,1842 P = (-1,3410)	0,1851 P = (1,3479)
<b>HO (%)</b>		- 0,2099 P = (-1,5478)	- 0,0006 P = (- 0,0041)	0,1103 P = (0,8004)

## 5. DISSCUSÃO

Diversas pesquisas têm sido direcionadas ao estudo da concentração específica do crioprotetor e ao uso de crioprotetores alternativos como a dimetil formamida, com o objetivo de diminuir o estresse osmótico e os danos causados pelos processos de resfriamento, congelamento e aquecimento. Atualmente tem sido estabelecida concentração de 5% para a utilização da dimetil formamida como crioprotetor no meio extensor para o congelamento, diminuindo os efeitos deletérios causados pelo estresse osmótico na adição do crioprotetor ao meio extensor (Medeiros et al., 2003).

O uso da dimetil formamida no presente estudo foi motivado pelos bons resultados em estudos prévios. Alvarenga et al., 2005 em estudos realizados com sêmen congelado utilizando dezessete ganhões e utilizando o extensor seminal INRA 82

demonstraram que o uso da dimetil formamida e metilformamida melhora significativamente as variáveis espermáticas estudadas pós-descongelamento comparadas com o uso de glicerol e dimetil acetamida como crioprotetores no extensor seminal. Estes pesquisadores encontraram motilidades de 42/13; 37/14; 30/12; 15/5; para dimetil formamida, metilformamida, diacetamida, e glicerol respectivamente, utilizando o método de CASA para a análise sistematizada das motilidades. Já Graham (2000), observou que a percentagem de espermatozoides móveis após o descongelamento foi muito mais baixa em sêmen congelado em diluïdor contendo dois tipos de amidas, como acetamida e metilacetamida, quando comparado com a metilformamida e a dimetilformamida. Este autor encontrou que a utilização de crioprotetores como formamida, acetamida e metilacetamida resultam em menos que 20% de

motilidade total dos espermatozoides pós-descongelamento.

Também Vidament et al. (2002) demonstraram a eficácia da utilização da dimetil formamida a 2% na melhora significativa da motilidade pós-descongelamento.

Em estudos recentes para avaliar a eficiência nas formas de adição do crioprotetor ao meio extensor base em uma única etapa comparada a múltiplas etapas, adição do crioprotetor em múltiplas etapas foi mais eficaz na preservação das motilidades total, progressiva, integridade funcional da membrana plasmática, integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal e, além disso, promoveu maior resistência dos espermatozoides ao teste de termoresistência, e esta superioridade na adição do crioprotetor em múltiplas etapas foi independente da curva de resfriamento adotada (Mello, 2005).

Com relação à temperatura e à metodologia de aplicação do crioprotetor, de modo geral, os resultados aqui encontrados foram semelhantes aos anteriormente verificados por Mello (2005). Mais ainda, neste experimento não foi encontrada diferença significativa entre

a adição fracionada a dez, vinte e trinta minutos e sua influência na conservação dos parâmetros espermáticos desejáveis. Desta forma, com relação a dimetil formamida os resultados indicam que o fracionamento em dez minutos comparado ao tempo de vinte e trinta minutos, é suficiente para minimizar os danos dos efeitos do choque osmótico aos espermatozoides. Este fato, presumivelmente, poderia ser explicado pela adição da dimetil formamida à temperatura ambiente 22°C a qual proporcionaria suficiente penetração do crioprotetor na célula, devido ao baixo peso molecular fato que evidencia os achados por (Vidament et., al 2002).

Outro resultado relevante aqui demonstrado foi que, independente da forma de adição do crioprotetor, não houve diferenças entre as curvas de congelamento na qualidade *in vitro* do sêmen descongelado. Este fato demonstra que a adição gradativa da dimetil formamida forneceu o mesmo nível de proteção para os espermatozoides submetidos aos três protocolos de congelamento aqui testados. Assim, a adição gradativa da dimetil formamida apresentou efeitos similares comparando-se os métodos convencionais de congelamento exposição das palhetas ao vapor de

nitrogênio, ao método de congelamento computadorizado com taxas programáveis, que necessita de aparelho sofisticado.

Resultados diferentes foram obtidos por Alvarenga et al. (2005), que compararam diferentes curvas de congelamento para o sêmen congelado com dimetil formamida e dimetil acetamida utilizando quatro diferentes protocolos para o resfriamento e congelamento, a percentagem de espermatozoides com rápido movimento e integridade da membrana plasmática foi significativamente maior ( $P < 0,05$ ), em amostras resfriadas e com o resfriamento prévio (tempo de equilíbrio) ao congelamento. Este fato contradiz os achados do presente experimento que não evidenciou qualquer diferença nos parâmetros avaliados quando do uso ou não de tempo de equilíbrio pré-congelamento ou diferentes curvas de congelamento. Não foram observadas diferenças significativas entre as curvas de congelamento moderada e rápida

No presente experimento não foi encontrada diferença significativa entre os tempos de adição do crioprotetor e entre as interações das curvas de resfriamento com tempo de equilíbrio prévio ao congelamento e com as

diferentes curvas de congelamento. Estes achados corroboram os achados encontrados por Moffet et al. (2003), apesar de estes autores utilizarem protocolos diferentes para o congelamento. Nesse estudo não foram encontradas diferenças significativas no sêmen congelado com dimetil formamida em extensor lactose-EDTA-gema de ovo sem resfriamento prévio, e o diluïdor leite desnatado-gema de ovo resfriado a 5°C com tempo de equilíbrio de 2 horas antes do congelamento.

As características físicas do sêmen neste experimento estiveram dentro dos parâmetros desejáveis para a espécie equina segundo Jasko (1992). No entanto, valores mais baixos nas motilidades total e progressiva foram observados após o descongelamento, corroborando com outros experimentos nos quais foram observadas variações entre os garanhões, os ejaculados e os diluïdores (Graham, 1996; Mckinnon, 1996; Vidament et al., 1997; Cottorello, 2002 e Snoeck, 2003). Esse decréscimo nos valores das características espermáticas pós-descongelamento pode ser explicado pelas mudanças e danos irreversíveis sofridos pelos espermatozoides durante o processo de resfriamento e congelamento, tais como,



choque térmico, efeito solução e formação de cristais de gelo.

Segundo Brinsko et al. (2000) uma motilidade espermática superior no sêmen fresco resulta em motilidade espermática superior pós-descongelamento. Esta característica não foi observada neste experimento devido ao fato de que os seis garanhões utilizados possuíam parâmetros espermáticos muito semelhantes no pré-congelamento e estes animais apresentaram respostas diferentes ao processo de criopreservação, corroborando com os achados feitos por Samper (1992), Cottorelo (2002) e Snoeck (2003).

Segundo Vidament et al. (1997) cavalos com bom sêmen a fresco mostram boa congelabilidade e boa fertilidade para o sêmen congelado. Esta observação não pode ser confirmada pelos dados encontrados neste experimento devido, particularmente, ao garanhão número seis que apresentou boa motilidade espermática no sêmen a fresco e queda significativa da motilidade no sêmen pós-descongelamento. Do mesmo modo, os resultados das motilidades progressivas no pós-descongelamento deste garanhão foram inferiores a dos demais garanhões, fato que evidencia

como a idade, raça e manejo podem influenciar nos parâmetros espermáticos pós-descongelamento.

Em relação a variável vigor espermático, não houve diferença entre os tempos de adição do crioprotetor e as diferentes curvas de resfriamento / congelamento estudado ( $P > 0,05$ ). Em outros trabalhos com criopreservação de sêmen na espécie equina (Cottorelo; 2002; Snoeck 2003; Mello 2005), resultados semelhantes foram encontrados, nos quais não foram observadas diferenças significativas entre o vigor espermático pré e pós-descongelamento. Tal fato pode ser explicado presumivelmente pela composição do meio extensor INRA 82 que contém substâncias nutritivas que permitem que o espermatozóide mantenha seu metabolismo mesmo após o descongelamento.

Não foram encontradas diferenças entre os tempos de adição do crioprotetor e as curvas de congelamento na preservação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, este resultado sugere que os espermatozoides podem ser congelados em um tempo de adição do crioprotetor de dez, vinte e trinta minutos independentes da taxa de resfriamento, tempo de equilíbrio e curvas de congelamento. Achados

similares à porcentagem de membranas íntegras foram citados por Vidament et al. (2005), que utilizaram para o congelamento diluïdor INRA 82 e glicerol a concentraçãõ de 2,5% como crioprotetor, em máquina computarizada para o controle da curva de resfriamento e tempo de equilíbrio a 4°C durante 60 minutos. As curvas de congelamento com aparelho programável neste último experimento foram de - 40° /min; - 60° /min; até - 140°C quando então as amostras foram colocadas no nitrogênio líquido.

A porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico no presente trabalho foi similar aos valores para a espécie eqüina com sêmen congelado citados por Neild et al. (1999) utilizando diferentes açúcares para o teste hiposmótico como frutose, sacarose e lactose com diferentes osmolaridades que variaram de 25 mOsmol até 300 mOsmol, estes relataram valores médios para as diferentes osmolaridades oscilando entre 7,6% 23,3% 33,2% 45,6% 49,6%. No presente experimento, não foi observada diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre os tempos de adição do crioprotetor uma vez que a adição do crioprotetor gradativamente por um tempo de vinte minutos apresentou o

maior número de células reativas enquanto o tempo de adição de trinta minutos apresentou o menor número de células reativas ao teste hiposmótico. Apesar destas diferenças numéricas não serem estatisticamente significativas, este achado possivelmente seja decorrente do fato de que o maior tempo de adição do crioprotetor acarretaria um maior estresse osmótico às células, lesando a integridade funcional de suas membranas.

## 6. CONCLUSÕES

O aumento do tempo para a adição fracionada do crioprotetor de dez para vinte ou trinta minutos não teve influência nos parâmetros espermáticos pós-descongelamento.

Não houve interação entre os tempos de adição fracionada do crioprotetor, curvas de resfriamento e curvas de congelamento na preservação das características espermáticas pós-descongelamento avaliadas *in vitro*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L.; Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review, *Animal Reproduction Science* .v.89, p.105–113, 2005.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. *Spermatozoal function*. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. (Eds.), *Equine reproduction*. Malvern: Lea & Fabiger, 1993.p.715-745.

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

ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K., FULLER, B.J. *Temperature and Animal Cells*. Cambridge. Biologists Ltd, 1987, p.395–406.

AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology*, v. 46, p. 791-797, 1997.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science*, v.68, p.181-190, 2001.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, IA: Iowa University Press., 1989. 285p.

BLACKSHAW, A. W.; SALISBURY, G. W. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-shock and its prevention. *Journal Dairy Science*, v. 40, p. 1099-1106, 1957.

BRINSKO, S.P.; ROWAN, K.R.; VARNER .D.D.; BLANCHARD, T.L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.53, p.1641-1655, 1999.

BOGART, R.; MAYER, D.T. The effect of egg yolk on various physical and chemical factors detrimental to spermatozoa viability. *Journal of Animal Science*, v.9, n.2, p.143-152, 1950.

BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v.54, p.129–136, 2000.

BRINSKO, S.P.; VAN WAGNER, G.S.; GRAHAM, J.K. et al. Motility, morphology and triple stain analysis of fresh, cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.56, p.111-120, 2000.

BRUEMMER, J.E.; COY, R.C.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48h. *Journal of Animal Science*, v. 80, p.12-18, 2002.

CHOW, P.Y.; WHITE, I.G.; PICKETT, B.W. Stallion sperm and seminal plasma phospholipids and glycerylphosphorylcholine. *Animal*

*Reproduction Science*, v, 11, p. 207-213, 1986.

COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P.; PICKETT, B.W. 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, p.25-39, 1984.

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

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

DARIN-BENNET, A.; POULOS, A.; WHITE, I. G. The phospholipids and phospholipids-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 44, p. 471-474, 1974.

DELL' AQUA JUNIOR, J. A. ; PAPA, F.O., Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelamento de sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n.3,v.25,2001, p. 460-462

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

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.A. field study of the fertility of transported equine

semen. *Theriogenology*, v. 22, p. 291-303, 1984.

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

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. *Journal of Reproduction and Fertility*, n.47, p.243-255, 1993.

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGLAS, M.S.J.; MERYMAN, H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, v. 27, p. 247–268, 1990.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.251-260, 1996.

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

GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. In: *of the International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 14<sup>th</sup>, 2000, Proceedings*. p. 307 (Abstract).

GRAHAM, J. K.; CRABO, B. G.; PACE, M. M. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *Journal of Animal Science*, v. 47, supplement 2, p. 80-119, 1978.

GILMORE, J.A.; MCGANN, L.E.; LIU, J.; GAO, D.Y.; PETER, A.T.; KLEINHANS, F.W.; CRITSER, J.K. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biological Reproduction*, V. 53, p. 985–995, 1995.

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

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. Factors affecting motion characteristic of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*, v.28, p.47-53, 1996.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p.3–22, 2000.

JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 8.n. 1, p.129-147, 1992.

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

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

JULIANI, G.; HENRY, M.; MELO, M. I. V. Freezing of equine semen in extenders with low density lipoproteins. In: *International. Congress. of Animal Reproduction, 15<sup>th</sup> Annals*. 2004. v.2, p. 498, (Abstract). 2004.

KAMPSCHMIDT, R. F.; MAYER, D. T.; HERMAN, H. A. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *Journal of Dairy Science.*, v. 36, p. 733-742, 1953.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.E.; AURICH, C. Activity of

glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology*, v.63, p. 1354-1365, 2005.

KATILA, T.; ANDERSON, M.; REILAS, T.; KOSKINEN, E. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. *Theriogenology*, v. 58, p. 241-244, 2002.

KEITH, S.L. *Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa*. Colorado, 1998. 104f. Tese (Master of Science). Colorado State University, Fort Collins.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. *Proc. Am. Assoc. Equine Practice.*, v.21, p.327-336, 1975.

LOOMIS, P.R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. *Procedures of American Association of Equine Practice*, v.38, p.629-647, 1992.

LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; BRINSKO, S. L.; RIGBY, R. S.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, v. 58, p 221-224, 2002.

MANUAL PARA O EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DE SÊMEN ANIMAL/ Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed. – Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GUNZEL, ANNE-ROSE. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction*

- and Fertility Supplement. p. 47-51, 1979.
- McKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Australian Equine Veterinarian*, v. 14, n. 4, p. 156-174, 1996.
- MAYER, D. T.; LASLEY, J. F. The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities, and fertilizing ability of mammalian spermatozoa. *Journal of Animal Science*, v. 4, p. 261-269, 1945.
- MAYERS, S.A. Spermatozoal response to osmotic stress. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.57-64, 2005.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of physiology*, v. 247, n.16, p.125-142, 1984.
- MEDEIROS, A.S.L. *Cryopreservation of stallion sperm utilizing different amides*. 2003 123f. (Master of Science Thesis). University of São Paulo State-UNESP, Botucatu.
- MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, v.58, p.273-276, 2002.
- MEDEIROS, A.S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Avaliação da integridade acrossomal de espermatozoides de garanhões criopreservados com crioprotetores a base de amidas e glicerol. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, 2003.
- MELO, M.I.V., HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, p.71-78, 1999.
- MELLO, F. G. C. *Efeitos das formas de adição da dimetil formamida ao meio diluidor base na preservação da viabilidade espermática eqüina pós-descongelamento avaliada in vitro*. (Tese de Mestrado). 2005.69f. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte,
- MERKT, H.; KLUG, E.; KRAUSE, D. et al. Results of long-term storage of stallion semen frozen by the pellet method. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 23, p. 105-106, 1975.
- MOFFET, P.D.; BRUEMMER, J.E.; CARD, C.; SQUIRES, E.L. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. *Proceedings Society for Theriogenology Annual Conference*, p. 42, (Abstract), 2003.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 63, p. 2372-2381, 2005.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.
- NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M. et al. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v.51, n.4. p.721-727, 1999.
- NELSON, R.W., COUTO, C.G. Inseminação artificial e sêmen congelado. In: *Fundamentos de medicina interna de pequenos animais:*

- Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.526-529:
- NIE, G.J.; WENZEL, J.G.W. Adaptation of the hypoosmotic test to asses functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, v.55, p.1005-1018, 2001.
- ORTMAN, K.; RODRIGUES-MARTINEZ, H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. *Journal of Veterinary Medicine American*, v.41, n.1, p.37-47, 1994.
- PACE, M.; SULLIVAN, J.J. Effect of timing insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 23. Supplement, p.115-121, 1975.
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: *proceedings of the 10<sup>th</sup> International Congress Animal Reproduction Artificial Insemination*. v.3, p. 377-378, 1984. (Abstract).
- PAPA, F. O.; DELL'AQUA Jr, J. A. Efeito do tipo de evasamento e método de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índice de fertilidade de sêmen congelado equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n. 3, v. 25, p. 458-460, 2001.
- PARINAUD, J.; LE LANNOU, D., VIEITENZ, G., GRIVEAU, J.F., LILHET, P., RICHOILLEY, G. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit©) following ejaculation. *Human Reproduction*, v. 12, p. 243-2436, 1997.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, n.2, p.209-222, 1992.
- PICKETT, B.W. Seminal extenders and cooled semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.), *Equine reproduction*, Malvern: Lea & Fabiger, 1993. p.746-754.
- PICKETT, B.W., AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.7, n.5, p.289-302, 1987.
- POULOS, A., DARIN-BENNET, A., WHITE, J. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Compendium of Biochemistry and Physiology*, v. 46, p. 541-549, 1973.
- PROVINCE, C. A.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B.W. et al. Cooling rates storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 23, n. 6, p. 925-954, 1985.
- QUINN, P. J.; WHITE, I. G.; CLELAND, K. W. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 18, p. 209-220, 1969.
- RAINGEAUD, J.; GUPTA, S.; ROGERS, J.S.; DICKENS, M.; HAN, J., ULEVITCH, R.J.; DAVIS, R.J. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *Journal of Biology and Chemistry*, v. 270, p. 7420-7426, 1995.
- RODRIGUES, J.L. Aspectos da congelação de embriões bovinos. In: REUNIAO DA SOCIEDADE

- BRASILERA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIOES, Jaboticabal, SP, *Anais*. Jaboticabal, SP: Sociedade Brasileira de transferencia de embriões, 1992, p.55-79
- ROUSE, J.; COHEN, P.; TRIGON, S.; MORANGE, M.; ALONSO-LLAMAZARES, A.; ZAMANILLO, D.; HUNT, T.; NEBREDA, A.R. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell*, v. 78, p.1027–1037, 1994.
- SAMPER, J.C. Evaluation of cryopreserved semen: an alternative assay. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplement*, v.88, p59-65, 1992.
- SILVA FILHO, J.M. *Avaliação do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial de equinos*. 1994. 408f. Tese (Doutorado em Zootecnia Viçosa), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- SEIDEL, G. E. Jr. Cryopreservation of equine embryos. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*, n.1, v.12, p. 85-99, 1996.
- SMITH, A.U., POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperature. *Nature*, v.166, p. 668–669, 1950.
- SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K., et al, Cooled and frozen stallion semen. *Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory Bull.* n n9 Fort Collins: Colorado State University, 1999.
- SNOECK, P. P. N. *Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade*. 2003 69f Tese (Mestrado em Medicina veterinária). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen seen in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 27, p. 53-59, 1979.
- TRIMECHE, A.; YVON, J. M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI. Effect of glutamine, proline, histidine, and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 52, p. 181-191, 1999.
- VARNER, D. D., BLANCHARD, T. L., LOVE, C. L. et al. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. *Theriogenology*, v. 29, p. 1043-1054, 1988.
- VIDAMENT, M. French field results (1985 – 2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Animal Reproduction Science*, v.89, p.115-136, 2005.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P., BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, v. 58, p. 249–251, 2002.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, v.48, p.907-917, 1997.
- VOLONTE, D.; GALBIATI, F.; PESTELL, R.G.; LISANTI, M.P. Cellular stress induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 (Tyr(14)) via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Src kinase. Evidence for caveolae, the actin cytoskeleton, and focal adhesions as



mechanical sensors of osmotic stress. *Journal of Biology Chemistry*, v..276, p.8094–8103, 2001.

WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: International Conference on Boar Semen Preservation, 3. Mariensee. Proceedings... Mariensee: 1996. p.135-140.

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

WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M.; ALLEN, W.E. Quantitative assessment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, v.35, p.651-653, 1987.

WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: International Conference On Deep Freezing Of Boar Semen, 1, 1985, Proceedins: Uppsala, 1985. p.113-126.

WEITZE, K.F., PETZOLDT, R. Preservation of semen. *Animal Reproduction Science*, v.28, n.1-4, p.229-235, 1992.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold schock and preservation: a review. *Reproduction and Fertility Development*, v.5, n.6., p.639-658, 1993.

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

## ANEXOS

### ANEXO 1

Composição do extensor básico utilizado INRA 82 com 20m moles hepes e dos extensores derivados D1 e D2.

COMPONENTES	1 LITRO
Glicose anidra	25 gr
Lactose monohidratada	1,5 gr
Raffinose pentahidratada	1,5 gr
Citrato de sódio dihidratado	0,25 gr
Citrato de potássio monohidratado	0,41 gr
Hepes	4,76 gr
Água	q.s.p. 0,5L
Leite desnatado UHT	0,5L
Sulfato de gentamicina	50mgr
Penicilina G	50,000 UI
pH	6,8
Osmolaridade	303mOsmol/L

---

FONTE: Magistrini e Palmer, 1984

#### EXTENSORES DERIVADOS:

D1: INRA 82 + 2% gema de ovo centrifugada

D2: INRA 82 + 2% gema de ovo centrifugada + 2,5% de gliceroL

## ANEXO 2

Preparação da solução hiposmótica de sacarose a 100 mOsmol/L.

---

### SACAROSE A 300 mOsmol/L

---

COMPONENTE	QUANTIDADE
Sacarose	10,7 gr
Água destilada	100 mL

---

FONTE: Melo e Henry, 1999

Sacarose a 100 mOsmol/L

Diluição de 1 parte de sacarose a 300 mOsmol/L: em 2 partes de água destilada

### ANEXO 3

Soluções de estoque e de trabalho utilizadas na técnica de sondas fluorescentes para a avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de células espermáticas eqüinas.

SOLUÇÕES	CONSTITUINTE	QUANTIDADE
I. Solução Estoque de CFDA	CDFA* DMSO*	2,3 mgr 5 mL
II. Solução Estoque de IP	IP* 0,9% NaCl*	
III. Solução Estoque de Formalina	Formol a 40% 0,9% NaCl	Diluição 1:80 100 mL de formol a 40% 7,9 mL de solução fisiológica
IV. Solução Estoque de Citrato de Sódio	Citrato de Sódio 0,9% NaCl	3gr 100 mL
V. Solução Trabalho	CDFA IP Formol Citrato de Sódio	20 mL 100 mL 10 mL 960 mL

FONTE: ZÚCARRI (1998)

\*CFDA: diacetato de carboxifluoresceína

\*IP: iodeto de propideo

\*DMSO: dimetil sulfóxido

\*NaCl: cloreto de sódio

## ANEXO 4

Fluxograma do processo de congelamento e descongelamento da célula espermática eqüina.

