ANTONIO SYLVIO LOPES DE MEDEIROS

RESISTÊNCIA OSMÓTICA, CONGELABILIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN DE GARANHÕES FRENTE A DIFERENTES CRIOPROTETORES

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu -SP, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária - Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Adj. MARCO ANTONIO ALVARENGA

BOTUCATU - SP

- 2007 -

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Medeiros, Antonio Sylvio Lopes de.
Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade do sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores / Antonio Sylvio Lopes de Medeiros. – Botucatu [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2007.
Orientador: Marco Antonio Alvarenga
Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino - Reprodução 2.Inseminação artificial
CDD 636.10824

Palavras-chave: Congelabilidade; Crioprotetores; Espermatozóides; Garanhões; Resistência Osmótica

DEDICO...

A DEUS

Senhor, meu coração não se enche de orgulho, meu olhar não se levanta arrogante.
Não procuro grandezas, nem coisas superiores a mim, ao contrario mantenho em calma e sossego minha alma.
Assim está a minha alma em mim mesmo.

Salmo 130.

Numa só palavra de Deus compreende-se duas coisas.
A Deus pertence o poder, ao senhor pertence à bondade, pois dais a cada um segundo suas obras.

Salmo 61- 12, 13.

A minha Família.

A minha esposa Aparecida, minhas filhas Marina e Milena e ao meu filho Gabriel, o mais novo integrante de minha família, que surgiu durante esta jornada para me encher de energia e motivação.
Agradeço do fundo do meu coração, pela paciência, pelo estimulo e apoio em minhas conquistas e derrotas.
Vocês serão sempre a razão de meu existir.

Aos meus pais.

Ludovico Lopes de Medeiros Neto e Maria Isabel Ornelas Lopes de Medeiros.
Pessoas de fibra, que diversas vezes renunciaram seus interesses próprios em razão dos meus.
Os quais eu devo minha educação e meu caráter, moldados em valores concretos da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga.

Pela orientação, não só neste projeto, mas também em minha vida profissional.

Aproveito para expressar meus agradecimentos, principalmente pela paciência, pela confiança e pelos exemplos de competência e caráter.

Ao meu amigo Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa.

Como em meu Mestrado, foi meu grande incentivador, transmitindo um entusiasmo contagiante através das pesquisas voltadas à Área de Reprodução Animal.

Ao meu amigo José Antonio Dell´Aqua Jr., pelo companheirismo, apoio e incentivos em momentos decisivos em minha vida profissional.

À minha amiga Fabiana Ferreira de Souza, pelos ensinamentos, paciência e companheirismo durante a execução das avaliações de eletroforese.

Ao Gustavo Henrique M. Araújo, pelo auxilio nas análises estatísticas.

Aos amigos de pós–graduação Marcio Teoro do Carmo, Daniel Pasquini, Gabriel Felício, Heder Nunes Ferreira, Viviane Helena

Chirinéa pela grande ajuda neste projeto e pelos momentos de descontração.

À Professora Dra. Maria Denise Lopes, por ter aberto as portas de seu laboratório para execução das avaliações de eletroforese.

Aos Professores Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Dr. Sony Dimas Bicudo, Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, Dr. Nereu Carlos Prestes, Dr. Cezinande de Meira e Dra. Eunice Oba, pelas aulas ministradas e dúvidas solucionadas durante o curso de Doutorado.

Aos Funcionários do Departamento de Reprodução, Edilson de Souza Freire, Maria Cristina Paganini Listoni Rosa, Valter Oswaldo Fabris e Miguel Alves da Silva, Márcio José Figueira e José Maria Pimentel, por suas ajudas durante o trabalho e momentos de descontração nos tempos vagos.

Ao Professor Dr. José Nicolau P. Puoli Filho, pelos ensinamentos e pela abertura da Fazenda Edgárdia para a execução do teste de fertilidade deste projeto.

Aos Funcionários da Fazenda Edgárdia, Sr. Benedito, Sr. Tamiro e Sr. João, pela grande colaboração no manejo das éguas utilizadas neste projeto.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Doutorado (Processo 02/14088-2).

DEDICO...

A Deus.

Senhor, meu coração não se enche de orgulho, meu olhar não se levanta arrogante.
Não procuro grandezas, nem coisas superiores a mim, ao contrario mantenho em calma e sossego minha alma.
Assim está a minha alma em mim mesmo.

Salmo 130.

Numa só palavra de Deus compreende-se duas coisas.
A Deus pertence o poder, ao senhor pertence à bondade, pois dais a cada um segundo suas obras.

Salmo 61- 12, 13.

A minha Família.

A minha esposa Aparecida, minhas filhas Marina e Milena e ao meu filho Gabriel, o mais novo integrante de minha família, que surgiu durante esta jornada para me encher de energia e motivação.
Agradeço do fundo do meu coração, pela paciência, pelo estimulo e apoio em minhas conquistas e derrotas.
Vocês serão sempre a razão de meu existir.

Aos meus pais.

Ludovico Lopes de Medeiros Neto e Maria Isabel Ornelas Lopes de Medeiros.
Pessoas de fibra, que diversas vezes renunciaram seus interesses próprios em razão dos meus.
Os quais eu devo minha educação e meu caráter, moldados em valores concretos da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga.

Pela orientação, não só neste projeto, mas também em minha vida profissional.

Aproveito para expressar meus agradecimentos, principalmente pela paciência, pela confiança e pelos exemplos de competência e caráter.

Ao meu amigo Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa.

Como em meu mestrado, foi meu grande incentivador, transmitindo um entusiasmo contagiante transmitido nas pesquisas voltadas a área de Reprodução Animal.

Ao meu amigo José Antonio Dell´Aqua Jr., pelo companheirismo, apoio e incentivos em momentos decisivos em minha vida profissional.

A minha amiga **Fabiana,** **pelos ensinamentos, paciência e companheirismo durante a execução das avaliações de eletroforese.**

Ao Gustavo Araújo, pelo auxilio nas análises estatísticas.

Aos amigos de pós – graduação Marcio Teoro do Carmo, Daniel Pasquini, Gabriel Felício, Heder Nunes Ferreira, Viviane Chirimeia pela grande ajuda neste projeto e pelos momentos de descontração.

A Professora Dra. Maria Denise Lopes, por ter aberto as portas de seu laboratório para execução das avaliações de eletroforese.

Aos Professores Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Dr. Sony Dimas Bicudo, Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, **Dr.** Nereu Carlos Prestes, Dr. Cezinande de Meira pelas aulas ministradas e dúvidas solucionadas durante o curso de mestrado.

Aos Funcionários do departamento de Reprodução, Edilson, Cristina Valter e Miguel por suas ajudas durante o trabalho e momentos de descontração nos tempos vagos.

Ao Professor Dr. Nicolau Puoli Filho, pelos ensinamentos e pela abertura da Fazenda Edigardia para a execução do teste de fertilidade deste projeto.

Aos Funcionários da Fazenda Edigardia, Senhor Benedito, Senhor Tamiro e Senhor João, pela grande colaboração no manejo das éguas utilizadas neste projeto.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (Processo 02/14088-2).

INDÍCE

Lista de Tabelas.....a

Lista de Gráficos.....b

Anexos.....c

Resumo.....d

1. Introdução.....

2. Revisão de Literatura.....

2.1 Comportamento das células espermáticas em baixas temperaturas

2.2 Agentes crioprotetores adicionados ao meio diluente de congelação

2.2.1 Agentes crioprotetores não penetrantes

2.2.1.1 Açucares.

2.2.1.2 Gema de ovo.

2.2.1.3 Proteínas do leite.

2.2.1.4 Aminoácidos.

2.2.2 Agentes crioprotetores penetrantes.

2.2.2.1 Glicerol.

2.2.2.2 Etilenoglicol.

2.2.2.3 DMSO (Dimetilsulfóxido)

2.2.2.4 Amidas.

2.3 Métodos de avaliação do sêmen pós-descongelação.

2.3.1 Avaliação da Motilidade espermática.

2.3.2 Avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides.

2.3.3 Avaliação da integridade acrossomal.

3. Materiais e Métodos.....

3.1 Experimentos.

3.1.1 Experimento I.

3.1.2 Experimento II.

3.2 Animais.

3.3 Análise e processamento do sêmen a fresco.

3.4 Crioprotetores e meio diluente utilizado na congelação das amostras do experimento I e II.

3.5 Acondicionamento, estabilização e congelação das amostras dos experimentos I e II.

3.6 Descongelação das amostras.

3.7 Metodologias de avaliação espermática pós-descongelação do experimento I.

3.7.1 Análise da Motilidade espermática por Microscopia óptica.

3.7.2 Análise computadorizada do movimento espermático.

3.7.3 Análise da integridade da membrana espermática através de sondas fluorescentes.

3.7.4 Análise ultraestrutural da integridade acrossomal através de Microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.7.5 Avaliação da integridade acrossomal através de sondas fluorescentes.

3.7.6 Teste de Fertilidade do sêmen pós-descongelação.

3.8 Metodologias de avaliação espermática pós-descongelação do experimento II.

3.8.1 Análise da Motilidade espermática por Microscopia óptica.

3.8.2 Análise Computadorizada do movimento espermático.

3.8.3 Análise da integridade da membrana espermática através de sondas fluorescentes.

4. Análise Estatística.

5 Resultados.

5.1 Resultados do experimento I.

5.2 Resultados do experimento II.

6. Discussão.

7. Revisão bibliográfica.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS..... **i**

LISTA DE GRÁFICOS..... **iv**

LISTA DE FIGURAS..... **v**

LISTA DE ANEXOS..... **vi**

1. INTRODUÇÃO..... **01**

2. OBJETIVOS..... **03**

3. REVISÃO DE LITERATURA..... **04**

3.1. Fatores que influenciam a congelabilidade do sêmen..... **04**

3.1.1. Fatores individuais relacionados à congelabilidade e regulação osmótica da célula espermática..... **04**

3.1.2. Meios diluentes e substâncias crioprotetoras..... **11**

3.1.3. Taxa de congelação..... **20**

4. MATERIAIS E MÉTODOS..... **23**

Experimento I..... **23**

Experimento II..... **28**

Experimento III..... **34**

5. RESULTADOS..... **36**

Experimento I..... **36**

Experimento II..... **44**

Experimento III..... **58**

6. DISCUSSÃO..... **60**

7. CONCLUSÕES..... **71**

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... **72**

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **73**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Médias em porcentagem e Desvio Padrão dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) computadorizada e integridade de membrana plasmática (IMP) em comparação aos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%), de diferentes garanhões (n=27)..... **39**

Tabela 02: Médias em porcentagem e Desvio Padrão dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) computadorizada e integridade de membrana plasmática (IMP) em comparação aos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%), de garanhões de congelabilidade aceitável (n=9)..... **39**

Tabela 03: Médias em porcentagem e Desvio Padrão dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) computadorizada e integridade de membrana plasmática (IMP) em comparação aos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%), de garanhões de congelabilidade não aceitável (n=12)..... **40**

Tabela 04: Médias em porcentagem e Desvio Padrão dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) computadorizada e integridade de membrana plasmática (IMP) em comparação aos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%), dos garanhões de alta congelabilidade (n=4)..... **40**

Tabela 05: Médias em porcentagem e Desvio Padrão dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) computadorizada e integridade de membrana plasmática (IMP) em comparação aos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%), dos garanhões de baixa congelabilidade (n=6)..... **41**

Tabela 06 – Médias em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +) de espermatozóides de garanhões expostos ao estresse osmótico em soluções a 1 Molar dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL). (n=10 garanhões/ 20 ejaculados)..... **48**

Tabela 07 – Médias em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +), dos

espermatozóides de garanhões em solução isosmótica, após serem submetidos ao estresse osmótico nas soluções hiperosmóticas dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL). (n=10 garanhões/ 20 ejaculados). **49**

Tabela 08 - Médias em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +) dos espermatozóides de garanhões de alta congelabilidade expostos ao estresse osmótico em soluções a 1 Molar dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL). (n=4 garanhões/ 8 ejaculados)..... **50**

Tabela 09 - Médias em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +), dos espermatozóides de garanhões de alta congelabilidade, em solução isosmótica, após serem submetidos ao estresse osmótico nas soluções hiperosmóticas dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL). (n=4 garanhões/ 8 ejaculados)..... **51**

Tabela 10 - Médias em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +) dos espermatozóides de garanhões de baixa congelabilidade expostos ao estresse osmótico em soluções a 1 Molar dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL). (n=6 garanhões/ 12 ejaculados)..... **52**

Tabela 11 - Médias em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +), dos espermatozóides de garanhões de baixa congelabilidade, em solução isosmótica, após serem submetidos ao estresse osmótico nas soluções hiperosmóticas dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol. (n=12 ejaculados/6 garanhões)..... **53**

Tabela 12 - Médias em percentagem e desvio padrão dos parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), integridade de membrana (IMP) e integridade acrossomal (IAC) dos espermatozóides de garanhões de alta congelabilidade expostos ao estresse osmótico com os diferentes tratamentos, nas situações de exposição à solução hiperosmótica e isosmótica (n=8ejaculados/4 garanhões)..... **54**

Tabela 13 – Percentual de perda nos parâmetros de motilidade total e progressiva computadorizada, integridade de membrana e acrossomal, após os espermatozóides de garanhões de alta congelabilidade, serem submetido ao estresse osmótico, nos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL), em relação ao controle..... **55**

Tabela 14 – Médias em percentagem e desvio padrão dos parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), integridade de membrana (IMP) e integridade acrossomal (IAC) dos espermatozóides de garanhões de baixa congelabilidade expostos ao estresse osmótico com os diferentes tratamentos, nas situações de exposição à solução hiperosmótica e isosmótica (n=12 ejaculados/6 garanhões)..... **56**

Tabela 15 – Percentual de perda nos parâmetros de motilidade total e progressiva computadorizada, integridade de membrana e acrossomal, após os espermatozóides de garanhões de baixa congelabilidade, serem submetido ao estresse osmótico, nos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL), em relação ao controle..... **57**

Tabela 16 – Percentual de fertilidade do sêmen de garanhões de Alta (G11) e Baixa (G33) congelabilidade, quando submetidos ao estresse osmótico nos diferentes crioprotetores: dimetiacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL)..... **59**

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1 - Comparação dos parâmetros de motilidade total e integridade de membrana espermática pós-descongelação entre os garanhões de congelabilidade aceitável e não aceitável, segundo os diferentes tratamentos..... **41**

Gráfico 02 - Comparação dos parâmetros de Motilidade Total e Integridade de Membrana espermática pós-descongelação entre os garanhões de congelabilidade aceitável e não aceitável..... **42**

Gráfico 03 - Comparação dos parâmetros de motilidade total e integridade de membrana espermática pós-descongelação entre os garanhões de congelabilidadeaceitável, segundo diferentes tratamentos. **42**

Gráfico 04 - Comparação dos parâmetros de motilidade total e integridade de membrana espermática pós-descongelação entre os garanhões de congelabilidade não aceitável, nos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%)..... **43**

Gráfico 05 - Comparação entre garanhões de Alta (n=4) e Baixa congelabilidade (n=6) no parâmetro de motilidade total espermática pós-descongelação nos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%) **43**

Gráfico 06 - Comparação entre garanhões de Alta (n=4) e Baixa (n=6) congelabilidade com médias de Integridade de membrana espermática pós-descongelação nos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%)..... **44**

Gráfico 07 - Comparação entre a fertilidade do sêmen de garanhões de Alta (G11) e Baixa (G33) congelabilidade, quando submetidos ao estresse osmótico nos diferentes crioprotetores: dimetiacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL)..... **59**

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Esquema da metodologia aplicada no Experimento I..... **27**

Figura 02 - Fotos de espermatozóides corados com iodeto de propídeo, FITC-PNA, JC1..... **32**

Figura 03 - Esquema da metodologia do Experimento II..... **33**

Figura 04 - Ilustração da curva, com mediana, para distribuição da motilidade total do tratamento com glicerol, incluindo a seleção dos garanhões pertencentes ao Quartil superior e inferior..... **38**

Figura 05 - Ilustração da curva, com mediana, para distribuição da integridade de membrana do tratamento com glicerol, incluindo a seleção dos garanhões pertencentes ao Quartil superior e inferior..... **38**

LISTA DE ANEXOS

Anexo 01 - Motilidade total (MT) e Motilidade progressiva (MP) computadorizada e Integridade de membrana (INT), pós – descongelação quando da utilização dos crioprotetores a 5% (v/v): dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL), na seleção dos garanhões utilizados no experimento.

Anexo 02 - Soluções de estoque para a utilização na técnica de fluorescência para avaliação de integridade de membrana.

Anexo 03 - Solução de Trabalho para coloração fluorescente.

Anexo 04 - Protocolo de fluorescência das combinações de sondas fluorescentes.

ABSTRACT

The sperm osmotic stress induced by the cryprotectors during cryopreservation is an important factor involved on sperm viability. The present study aimed to study the viability and fertility after induction of osmotic stress using different amides and glycerol. Experment 1 aimmed to study the semen freezability of 27 stallions with the utilization of the cryoprotectors dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL), the amidas based cryoprotectors were superior to glycerol in the ability to preserve pos thaw motility and membrane integrity ($p<0,001$). From these 27 stallions 9 were selected and classified with acceptable freezability and 12 as non acceptable freezabilty based on post thaw quality after frozen with GL. No differences were observe on total motility (TM), progressive motility (PM) and membrane integrity (MI) for the acceptable and non acceptable freezabilty groups. Four stallions with higher freezabilty were selected from the acceptable group and no differences between amides and glicerol were observed ($p>0.05$). From the non acceptable group 6 stallions with lower freezability were sellected, and amides were superior to GL for all post thaw evaluated parameters. ($p<0,0001$). On Experiment II, the same 10 stallions were used to evaluated the effect of the osmotic stress on the viability of fresh semen. The semen was incubated for 10 minuts in a 1 Molar solution of each studied cryoprotector. A significant decrease on total motility were observed after the incubation on the hypertonic solution ($12,93±15,22^{d}$; $61,53±16,17^{b}$; $44,67±22,68^{c}$; $41,73±24,28^{c}$, DA, MF, DF e GL respective) when compared with the control group ($81,4±9,15^{a}$). The lower motility was observed on the DA treatment. Also a higher decrease in the membrane integrity was observed in the solution of DA, MF, DF e GL ($48,47±9,49^{bc}$, $49,20±8,47^{bc}$, $53,07±12,04^{b}$, $42,33±12,15^{c}$ respectively) compared with control ($61,87±13,62^{a}$). The GL treatment induced a higher membrane damage ($p<0,0001$). When the sperm returned to an isosmolarity condition (300 mOsm) the total motility was higher for all amides ($p<0,0001$) compared with glycerol ($66,33±15,03^{b}$, $72,8±11,43^{b}$, $66,73±13,44^{b}$, $43,33±24,56^{c}$ DA, MF, DF e GL respectively). Also the membrane integrity was

superior for the of amides ($p<0,0001$) compared with glycerol ($3767\pm9,47^{b}$, $40,47\pm8,47^{b}$, $38,13\pm1,65^{b}$, $22\pm13,49^{c}$ DA, MF, DF e GL respectively).

O Experimento III a fertility trial was conducted after induction of an osmotic stress with the hyperosmotic solutions of amides and Glycerol using a final concentration of 1 Molar. After this, the solutions return to a normal osmolarity. A total of 250 cycles were used from 25 mares that were monitored with ultrasonography and 500 millions sperms were used for AI. When semen from a high freezability stallion was used the fertility was to control group 80% (20/25); DA 72% (18/25), MF 80% (20/25), DF 68% (17/25) e GL 60% (15/25), and no statistics differences were observed ($p>0,05$). The fertility rates with the poor freezer stallion were: Control group $72\%^{a}$ (18/25); DA $40\%^{b}$ (10/25), MF $44\%^{ab}$ (11/25); DF $32\%^{b}$ (8/25); GL 0^{c} (0/25). On the total of inseminations from both stallions it was again observed a superiority of the amides treatments to the glycerol group the fertility rates were to control group $76\%^{a}$ (38/50), DA $56\%^{ab}$ (28/50), MF $62\%^{ab}$ (31/50), DF $52\%^{abc}$ (26/50), GL $30\%^{c}$ (15/50). The fertility trials results showed a difference among the stallions with different pattern freezability in relation to spermatic osmotic resistance to cryoprotectors . This sensibility was evident in the low freezability stallion. This individual characteristics among stallions can be related to a better spermatic osmotic regulation from high freezability stallions. The amides showed to induce a smaller damage then glycerol. This factor can be related to a better permeability of the amides in the sperm cell resulting in lower injuries.

RESUMO

O estresse osmótico induzido pelos crioprotetores aos espermatozóides durante o processo de criopreservação é um dos principais fatores que comprometem a viabilidade espermática. O presente estudo objetivou avaliar a viabilidade dos espermatozóides de garanhões submetidos ao estresse osmótico com diferentes tipos de amidas e glicerol. O Experimento I teve como objetivo estudar a congelabilidade do sêmen de 27 garanhões, quando da utilização dos crioprotetores dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL), onde crioprotetores a base amidas foram superiores em relação ao glicerol em preservar a motilidade e a integridade da membrana espermática ($p<0,001$). Dentre os 27 garanhões selecionou-se, 9 indivíduos de congelabilidade aceitável, 12 indivíduos de congelabilidade não aceitável quando do uso do GL. No grupo de congelabilidade aceitável não houve diferença entre os crioprotetores quanto a motilidade total (MT), quanto a motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana (IM). No grupo de congelabilidade não aceitável as amidas foram sempre superiores ao glicerol quanto a MT, MP e IM ($p<0,001$). Entre os animais de congelabilidade aceitável foram selecionados 4 indivíduos de alta congelabilidade, onde não se observou diferenças entre os tratamentos amidas em comparação ao glicerol nos parâmetros de MT, MP e IM ($p>0,05$). Entre os animais de congelabilidade não aceitável selecionou-se 6 garanhões, para os quais os tratamentos amidas foram superiores ao glicerol em todos os parâmetros avaliados ($p<0,0001$).

No Experimento II, foram utilizados os 4 garanhões de alta congelabilidade e 6 de baixa congelabilidade. Avaliou-se a viabilidade dos espermatozóides de garanhões submetidos ao estresse osmótico com soluções hipertônicas dos crioprotetores a base de amidas e Glicerol na concentração de 1 Molar. O sêmen foi incubado por 10 minutos, em seguida realizou-se uma rediluição para retorno a isosmolaridade.. Durante o período de incubação nas soluções hipertônicas observou-se uma queda na MT ($12,93\pm15,22^{d}$; $61,53\pm16,17^{b}$; $44,67\pm22,68^{c}$; $41,73\pm24,28^{c}$, DA, MF, DF e GL respectivamente) em relação ao controle ($81,4\pm9,15^{a}$) sendo esta queda mais evidente na solução de DA. Para o parâmetro integridade de membrana observou-se uma queda nas soluções

de DA, MF, DF e GL (48,47±9,49^{bc}, 49,20±8,47^{bc}, 53,07±12,04^{b}, 42,33±12,15^{c} respectivamente) em relação ao controle (61,87±13,62^{a}), sendo mais acentuada para o tratamento GL. Quando expostos a condição de isoosmolaridade os espermatozóides previamente incubados com os crioprotetores á base de amidas apresentaram uma Motilidade Total superior ($p<0,0001$) ao glicerol (66,33±15,03^{b},72,8±11,43^{b},66,73±13,44^{b}, 43,33±24,56^{c} DA, MF, DF e GL respectivamente). Em relação à integridade de membrana também se observou uma superioridade dos tratamentos amidas ($p<0,0001$) em relação ao glicerol (37,67±9,47^{b}, 40,47±8,47^{b}, 38,13±1,65^{b}, 22±13,49^{c} DA, MF, DF e GL respectivamente). O Experimento III objetivou avaliar a fertilidade dos espermatozóides de garanhões de Alta e Baixa congelabilidade submetidos ao estresse osmótico em soluções com crioprotetores a base de amidas (DA, MF,DF) e GL na concentração de 1 Molar. Utilizou-se 2 garanhões, sendo um garanhão de alta e um de baixa congelabilidade.. Foram utilizados 250 ciclos de 25 éguas os quais foram subdivididos entre os tratamentos DA, MF, DF, GL e grupo controle (25 ciclos/tratamento). Os índices de fertilidade com o garanhão de alta congelabilidade, foram: Grupo Controle 80% (20/25); DA 72% (18/25), MF 80% (20/25), DF 68% (17/25) e GL 60% (15/25), não havendo diferença estatística ($p>0,05$). Em relação à taxa de fertilidade obtida com garanhão de baixa congelabilidade os resultados foram: Grupo Controle 72%^{a} (18/25); DA 40%^{b} (10/25), MF 44%^{ab} (11/25); DF 32%^{b} (8/25); GL 0^{c} (0/25). No total das inseminações dos dois garanhões observou-se novamente uma superioridade dos tratamentos amidas em relação ao tratamento glicerol ($p<0,001$): Grupo controle 76%^{a} (38/50), DA 56%^{ab} (28/50), MF 62%^{ab} (31/50), DF 52%^{abc} (26/50), GL 30%^{c} (15/50). Os resultados de fertilidade obtidos neste experimento demonstraram haver uma diferença entre indivíduos resistência osmótica dos espermatozóides aos crioprotetores. Esta sensibilidade ficou evidente nos garanhões da raça Mangalarga Marchador principalmente quando do uso do Glicerol. Concluímos de forma geral as amidas induzem a um menor dano osmótico quando comparado ao glicerol, o que favorece a congelabilidade e fertilidade de sêmen de garanhões que apresentem resultados ruins quando do uso do Glicerol.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Agronegócio relacionado à indústria do cavalo ocupa lugar de destaque na economia de países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Estudo recente realizado pela CEPEA (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - ESALQ-USP) intitulado Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo, demonstrou que a contribuição que este setor trás a economia nacional ainda é pouco conhecida na geração de renda e postos de trabalhos. O setor movimenta um valor econômico superior a R$ 7,5 bilhões anuais, somente nas atividades analisadas, foram estimadas em cerca de 640.000 pessoas ocupadas e considerando que cada emprego direto corresponde a quatro empregos indiretos, tem-se 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, relacionados ao cavalo no Brasil. Baseados nestes números e a posição de destaque ocupada pelo Brasil como criatório a nível internacional, incrementa e incentiva investimentos no melhoramento genético e zootécnico do rebanho eqüino nacional.

Biotecnologias relacionadas à reprodução assistida contribuem de forma efetiva no ganho genético e melhoria da pecuária e sendo a inseminação artificial com sêmen congelado uma ferramenta singular na expansão qualitativa e econômica da pecuária bovina no Brasil e no mundo.

Porém a utilização de espermatozóides criopreservados para inseminação artificial apresenta uma denotação de baixa fertilidade, em relação ao sêmen a fresco na maioria das espécies animais.

Muitas espécies apresentam diferenças entre a sensibilidade dos espermatozóides a criopreservação e dentre estas existem indivíduos os quais possuem uma maior resistência ao processo de congelação e descongelação.

O fato de indivíduos apresentarem sêmen mais ou menos resistentes ao congelamento implica que determinadas características estruturais da membrana plasmática dos espermatozóides possam favorecer a sobrevivência destes em condições adversas impostas pela criopreservação. Estudos em diferentes espécies animais e principalmente em humanos evidenciam variabilidades no fator congelabilidade relacionados à técnica empregada no processo de congelação, ao meio diluente e seus constituintes utilizados, constituição da membrana espermática e principalmente um fator vem sendo

intensamente estudado pela comunidade cientifica é o de espermatozóides de diferentes espécies e indivíduos possuírem uma eficiência na regulação volumétrica celular que os confere uma maior ou menor resistência osmótica para suportar variações do ambiente extracelular durante o processo de congelação e descongelação.

Trabalhos recentes desenvolvidos demonstraram grandes variações quanto à resposta pós-descongelação dos espermatozóides entre garanhões, porém uma melhor resposta foi constatada, quando substituiu o glicerol do meio diluente por crioprotetores à base de amidas.

A criopreservação de sêmen de garanhões tem sido intensamente estudada, porém os fatores que determinam a variação da resposta pós-descongelação da célula espermática entre os garanhões, ainda permanecem obscuras.

2. OBJETIVOS

- Classificar a congelabilidade do sêmen de garanhões de diferentes raças frente aos crioprotetores dimetilacetamida, metilformamida, dimetilformamida e glicerol.

- Avaliar a resistência osmótica do sêmen de garanhões de alta e baixa congelabilidade, frente aos crioprotetores dimetilacetamida, metilformamida, dimetilformamida e glicerol.

- Avaliar a fertilidade do sêmen a fresco de garanhões de alta e baixa congelabilidade, submetidos ao estresse osmóticos com os crioprotetores dimetilacetamida, metilformamida, dimetilformamida e glicerol.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Fatores que influenciam a congelabilidade do sêmen

O processo de criopreservação de espermatozóides envolve diversos fatores que influenciam no resultado final como taxa de congelação e descongelação, meio diluente e substâncias crioprotetoras e principalmente a resistência individual dos espermatozóides de alguns indivíduos ao processo de congelação e descongelação (Holt, 2000).

3.1.1 – Fatores individuais relacionados à congelabilidade e regulação osmótica da célula espermática.

O fator individual em relação à congelabilidade tem sido intensamente estudado, e trabalhos como o de Tischener (1979), Aman e Picket (1987) e Vidament *et. al.* (1997), evidenciam este fator entre garanhões. No Brasil Alvarenga *et.al.,* (1996) observou esta característica em um levantamento realizado na Unesp-Botucatu, onde se estudou o sucesso e insucesso na congelação de sêmen eqüino, aproximadamente 80 garanhões de raças diferentes foram estudados, e concluiu-se que 50% dos garanhões de raças de hipismo (Hannoveriano, Holsteiner e Trackner) e Quarto de milha apresentavam sêmen com um bom padrão de motilidade pós-descongelação. Contudo, raças como Mangalarga e Mangalarga Marchador este percentual cai para 15%, demonstrando assim haver um fator racial e muitas vezes individual relacionado com a resistência espermática ao processo de congelação.

Em estudo sobre o assunto, pesquisadores franceses, ao avaliarem ejaculados de 161 garanhões observaram que destes 19, 30, 27 e 24% obtiveram índices de congelabilidade (motilidade após a descongelação) de 0%, 0 a 33%, 33 a 66% e acima de 66% respectivamente. Além disso, estes autores encontraram uma alta correlação entre fertilidade do sêmen a fresco e congelabilidade ($P<0,001$) e uma correlação média entre fertilidade do sêmen congelado e índice de congelabilidade (Vidament *et al.,* 1997). Posteriormente, na Alemanha os autores Blottner *et al.,* (2001), constataram que a resposta

pós–descongelação do sêmen de garanhões não é influenciada pela sazonalidade, e sim por fatores relacionados ao próprio individuo.

Diferenças de congelabilidade entre indivíduos de algumas raças foram observadas e resultados favoráveis foram obtidos, quando se utilizou crioprotetores amidas em sêmen de garanhões os quais apresentavam resultados pós - descongelações desfavoráveis com a utilização do glicerol como crioprotetor. (Medeiros *et. al.,*2002; Medeiros, 2003). Gomes *et. al.,* (2002) demonstraram melhorias nos parâmetros de motilidade computadorizada (CASA) e integridade de membrana com sêmen congelado com crioprotetores a base de amidas de garanhões Mangalarga Marchador em relação ao glicerol, sendo que raça é tida como as que apresentam resultados insatisfatórios do sêmen pós descongelação (Alvarenga *et. al*., 1996).

Alvarenga (2002) também encontrou resultados mais homogêneos em relação a congelabilidade do sêmen de garanhões com a dimetilformamida em comparação ao glicerol e também observou que os garanhões da raça Mangalarga Marchador foram os que menos resistiram ao processo de congelação quando do uso do glicerol como agente crioprotetor.

Fatores individuais também foram observados em espécies como suínos, no qual Hernandez *et. al.* (2006) demonstraram que espermatozóides de cachaços com baixa congelabilidade apresentam um maior percentual de lesões na cromatina espermática comparado com indivíduos de alta congelabilidade. Posteriormente estes autores constataram a existências de cachaços que apresentam variações quanto à congelabilidade do sêmen em relação ao protocolo de criopreservação utilizado e que a adequação de fatores como a taxa de descongelação e nível de glicerol no diluente melhora as respostas dos espermatozóides de indivíduos sensíveis aos protocolos de criopreservação tradicionais (Hernandez *et.al*., 2007). O trabalho desenvolvido por Thurston *et. al*., (2002) reforçaram a hipótese da existência de um fator individual em relação a congelabilidade de sêmen suíno por evidenciarem genes relacionados ao fator congelabilidade entre cachaços.

Dentre as variações entre espécies e indivíduos em relação à criopreservação, a sensibilidade ao choque frio, sofrido pelos espermatozóides durante o processo de refrigeração, tem uma importante participação nas injúrias celulares que acometem as células no processo de criopreservação.

Estudos correlacionam a suscetibilidade aos danos da refrigeração com a composição de lipídios da membrana entre as espécies, ou seja, espécies que contem concentrações de esteróides baixa e concentrações de ácidos graxos polinstaurados alta, são mais predispostos aos danos do choque térmico (Darin-Bennett et al., 1973). Os espermatozóides de touros, carneiros e garanhões são altamente sensíveis ao choque frio em comparação a espermatozóides humanos e de coelhos que são relativamente resistentes (Critser et. al.,1988; Watson, 1979; Watson, 1995). As membranas espermáticas apresentam-se num estado fluido, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções com plena eficiência. Os principais fatores que afetam esta fluidez são as composições relativas entre fosfolipídios e colesterol e a temperatura na qual a membrana é exposta.

Com a queda da temperatura os lipídios passam por uma transição, do estado fluído para um estado liquido cristalino, no qual as cadeias de ácidos graxos tornam-se desordenadas, com a continua queda de temperatura o estado de liquido cristalino é transformado em estado de gel nos quais, as cadeias de ácidos graxos organizam-se em um modelo paralelo, produzindo uma estrutura rígida, tornando estas áreas fracas, sujeita a rupturas, fusões e permeáveis a íons (Hammersted et al. 1990). A severidade das injurias celular é dependente da temperatura final e da taxa da queda da temperatura, afetando a estrutura e a função da membrana espermática (Amann & Pickett, 1987). Diferenças entre a congelabilidade foram demonstradas em cachaços, em relação a constituição lipídica e protéica da membrana espermática (Holt *et. al.,* 2005). A constituição dos ácidos graxos polinsaturados da membrana plasmática de espermatozóides suínos não evidenciaram a diferença entre a congelabilidade do sêmen de cachaços entre raças, mas sim entre indivíduos de uma mesma raça (Waterhouse *et. al*., 2006). A criopreservação de sêmen de cachaços afetou mais acentuadamente os espermatozóides de indivíduos classificados como mal congeladores em comparação ao grupo intermediário e aos bons congeladores. Estas diferença em relação a congelabilidade, foram associadas diferenças nos padrões da constituição de lipídeos dos espermatozóides, após a descongelação (Cerolini *et. al.,* 2001). Em espermatozóides de carneiros a criopreservação foi responsável pela alteração

da simetria trans-membrana dos fosfolipídios da camada externa da membrana plasmática dos espermatozóides (Muller et. al., 1999).

Diferenças na proporção de colesterol e fosfolipídios e na saturação dos ácidos graxos que compõe a membrana plasmática dos espermatozóides foram encontradas, em espécies de aves de diferentes padrões de congelabilidade. Galos domésticos possuem uma maior concentração de colesterol e uma menor quantidade de fosfolipídios da membrana plasmática de seus espermatozóides, conferindo a estes uma maior congelabilidade e fluidez de membrana pós – descongelação, comparados a perus os quais, possuem uma congelabilidade intermediaria e aos galos da guiné os quais possuem uma baixa congelabilidade (Blesbois *et. al.,* 2005). Os lipídios apresentam-se de uma forma dinâmica na membrana plasmática dos espermatozóides, e este fator é de extrema importância na funcionalidade da membrana nos diversos eventos que culminam na fertilização. Pesquisadores ingleses demonstraram que a criopreservação compromete significativamente estes lipídios da membrana espermática do sêmen humano e observaram que a lavagem destes espermatozóides com soluções e 0,4% de PVP restaurou a fluidez da membrana espermática, segundo a avaliação por anisotropia de fluorescência (James *e.al*., 1999).

A fluidez de membrana em espermatozóides de homens foi intensamente comprometida com o processo de criopreservação, em estudo onde envolveu o sêmen de 20 indivíduos, observou-se uma grande variação deste fator entre os indivíduos, a técnica de anisotropia por fluorescência, utilizada para avaliar a fluidez da membrana espermática mostrou-se muito eficiente em avaliar a qualidade das amostras de sêmen pós - descongelação (Giraud *et. al*.,2000), e posteriormente pela mesma técnica demonstrou-se que espermatozóides humanos normais possuem uma maior fluidez da membrana plasmática em comparação com espermatozóides anormais e uma menor quantidade de colesterol e fosfolipídios.

Tentativas em alterar a composição dos lipídios da membrana com a finalidade de melhorar a viabilidade espermática pós - descongelação, foi estudada em espermatozóides suínos, onde pesquisadores canadenses utilizaram lipídios oriundos da membrana espermática da região da cabeça de espermatozóides suínos e fosfolipídios sintéticos com cadeia definida e

concluíram que a incubação destes espermatozóides nestas soluções, trouxeram melhorias na motilidade e viabilidade espermática pós – descongelação, mas em contrapartida comprometeram os eventos de capacitação e reação acrossomal dos espermatozóides (He *et. al*., 2001). Em sêmen de garanhões a inclusão do colesterol na membrana espermática promoveu melhorias significativas nos parâmetros de motilidade e integridade de membrana pós – descongelação, no entanto a fertilidade deste sêmen foi grandemente prejudicada, este fato foi atribuído ao colesterol, incorporado na membrana plasmática dos espermatozóides, o qual impediu sua capacitação (Zahn, 2001).

Entre os constituintes da membrana plasmática dos espermatozóides, os componentes protéicos têm sido intensamente estudados e trabalhos evidenciam a participação destas proteínas na manutenção destas células durante a criopreservação. Estudos do perfil protéico dos espermatozóides de zebuínos foram realizados no Brasil, mostrando diferenças entre o sêmen fresco e congelado e, as possíveis relações com a capacidade de fecundação (Lima Dias, 2002; Marques et al*.,* 2000; Feliciano Silva *et al.,* 2004; Fernandes e Feliciano Silva, 2004). Em espermatozóides de garanhões Zahn et. al.,(2006) encontraram uma proteína a qual pode estar negativamente relacionada com congelabilidade do sêmen de garanhões e varias proteínas do soro sanguíneo correlacionada com a alta congelabilidade do sêmen de garanhões. Em touros Roncoletta, et. al. (1999) também correlacionou as proteínas do plasma seminal com a congelabilidade do sêmen de touros da raça Gir. Outros pesquisadores utilizando a técnica da eletroforese bidimensional encontraram proteínas do plasma seminal correlacionadas positivamente com a congelabilidade de sêmen de touros (Jobim et.al., 2003).

Proteínas, como os canais de água da célula espermática, responsáveis pela regulação osmótica dos espermatozóides, foram evidenciados no testículo e espermatozóides de camundongos e canais como os aquaporin, alem da função de canal de água, na membrana espermática também funcionam como de canal para entrada e saída do glicerol (Ishibashi *et. al*., 1997).

Proteínas responsáveis pela fosforilação da proteína Kinase, como a p38 e as p42/44 (EKR 1/2), são ativadas durante o estresse osmótico em células somáticas, em espermatozóides eqüinos (Meyers, 2005). O mesmo autor, demonstrou que a quantidade das proteínas p38 é mínima, durante o estresse osmótico, entretanto quando as amostras foram incubadas com os anticorpos anti – EKR 1/2 foram encontrados algumas diferenças entre os espermatozóides sobre o estresse osmótico.

A criopreservação expõe os espermatozóides a variações extremas de temperatura e osmolaridade. Durante a congelação com a formação dos cristais de gelo ocorre um aumento das concentrações de soluto no meio extracelular elevando a osmolaridade, nesta etapa as células perdem água com a finalidade de manter o equilíbrio entre o meio intra e extracelular. Quando estas células são expostas novamente a meios isotônicos como acontece na descongelação ou mesmo, quando entram em contato com secreções do trato reprodutivo das fêmeas, ocorre uma entrada de água na célula, devido às diferenças de osmolaridade do meio intra e extracelular (Holt & North, 1994; Holt, 2000).

A capacidade dos espermatozóides em responder diferenças de osmolaridade, com mudanças no volume celular, no meio extracelular é essencial para sobrevivência das células e esta regulação volumétrica celular é associado a fatores como composição de fosfolipídios, permeabilidade a água, temperatura da fase de transição dos lipídios, atividade das bombas Na+/K+ ATPase, canais de água e ions (Meyers, 2005). Em trabalho onde foram utilizados os inibidores oubain e amiloride dos canais Na+/K+ e Na+/K+ ATPase da célula espermáticas de garanhões, demonstrou-se que a regulação osmótica dos espermatozóides foram prejudicados (Caiza de La Cueva et al., 1997).

O processo de regulação osmótica da célula espermática foi atribuído a constituintes da membrana plasmática dos espermatozóides como os lipídios, canais de água e canais iônicos de cloreto e potássio (Petrunkina, 2007). Defeitos na regulação volumétrica dos espermatozóides foram responsáveis pela infertilidade do sêmen de cepas transgênicas de camundongos, o qual dificultaram o transporte espermático até o oviduto (Yeung et.al., 2000).

Espermatozóides de camundongos são extremamente sensíveis a alterações volumétricas da célula espermática mediada por diferenças osmóticas no meio diluente. Em trabalho desenvolvido por Yuksel et.al., (2002) evidenciaram uma extrema sensibilidade a crioprotetores penetrantes dos espermatozóides das linhagem dos camundongos estudados em comparação aos crioprotetores não penetrantes e notaram diferenças entre as linhagens no que se refere a permeabilidade da membrana espermática frente aos crioprotetores. Em espermatozóides a adição e remoção dos crioprotetores Glicerol, DMSO e etilenoglicol a 1Molar, causaram significativo decréscimo na motilidade espermática, sendo este efeito mais evidente com o glicerol e menor com a utilização do etilenoglicol (Guthrie et al., 2002). Esta característica também foi observada em espermatozóides de Chimpanzés, por esses possuirem uma maior permeabilidade ao etilenoglicol em comparação ao glicerol, no entanto a adição e remoção de crioprotetores não trazem prejuízos à célula espermática desta espécie animal (Yuksel et. al., 2005).

O crioprotetor DMSO promoveu maiores danos aos parâmetros de motilidade e integridade de membrana em espermatozoides de cães submetidos ao estresse osmótico com os crioprotetores glicerol, etilenoglicol e DMSO e também concluiu-se que diluentes a base de leite desnatado foram mais eficientes em manter a viabilidade espermática em comparação a diluentes a base de gema de ovo (Songsasen, et. al., 2002).

Petrunkina et. al.,(2004) relacionaram a capacidade de alguns cães de possuírem espermatozóides com uma maior eficiência na regulação osmótica celular, ao fato de apresentarem melhores resultados de congelabilidade, em relação a outros indivíduos na mesma espécie. Em outro estudo estes autores observaram um efeito protetor de um componente do diluente de congelação (Equex STM Paste) em condições de hipertonicidade do meio extracelular (Petrunkina *et. al*., 2005).

Caiza de la Cueva *et. al.,* (1997) estudaram os efeitos do estresse osmótico do sêmen de garanhões com soluções hipersaturadas de sais e glicerol e tambem incubaram os espermatozóides em substâncias as quais bloqueiam os canais Na+/K+ ATPase (oubaim e amiloride) e evidenciaram uma queda da viabilidade espermática quando os espermatozóides foram expostos a soluções hipersaturadas e comprovaram a hipótese da participação na

regulação osmótica celular dos canais Na+/K+ ATPase e Na+/K+ onde com a incubação das células espermáticas nestes componentes, comprometeram a regulação osmótica dos espermatozóides. Posteriormente estas características também foram observadas em sêmen de carneiros (Peris *et. al*., 2000).

Ball e Vo (2001) estudaram a tolerância osmótica do espermatozóide eqüino, quanto à adição e remoção dos crioprotetores, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol e glicerol, e concluíram que a adição e remoção do glicerol, resultou em um maior estresse osmótico, caracterizado por uma redução de motilidade, diminuição da integridade celular e acrossomal, quando comparado aos outros crioprotetores avaliados. Também observaram que uma diminuição na osmolaridade de 300 para 100 mOsm e um aumento por volta de 500mOsm acarreta uma queda acentuada na motilidade espermática, no entanto no parâmetro de integridade de membrana a diminuição da osmolaridade é mais prejudicial aos espermatozóides do que sua elevação. Pommer *et.al*.,(2002) em estudo onde objetivou estudar a tolerância osmótica de espermatozóides de garanhões na faixa de 75 a 900 mOsm, evidenciaram uma sensibilidade dos espermatozóides a mudanças bruscas de osmolaridade e observaram que apesar dos espermatozóides possuírem uma capacidade de restabelecer seu volume inicial, danos irreversíveis a sua membrana plasmática podem comprometer a capacidade fertilizante.

3.1.2 – Meios diluentes e substâncias crioprotetoras.

Os espermatozóides durante o processo de congelação são expostos a várias situações adversas a sua homeostase, podendo estas promoverem diversas injúrias celulares (Watson, 2000; Gao e Critser, 2000; Critser e Mobraaten, 2000). A presença de algumas substâncias tais como, açúcares, lipoproteína da gema do ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos, no meio diluídor alteram as propriedades físicas do processo de congelação da solução (Viskanta *et al.,* 1997; Wolfe & Bryant, 1999; Karow, 2001) e também promovem proteção aos espermatozóides no processo de criopreservação quanto à formação de cristais de gelo intracelular, desidratação excessiva da célula, danos osmóticos e oxidativos (Rowe, 1966; Holt, 2000).

Papa et. al., (1998), Arruda (2000) e Papa et. al. (2002), em trabalhos onde se estudou diluentes para congelação de sêmen de garanhões relataram a importância da interação entre as formulações de diluídores com substâncias crioprotetoras melhorando o desempenho da célula espermática nas avaliações laboratoriais e de fertilidade.

Durante décadas diluentes e constituintes têm sido estudados e testados na congelação de sêmen de garanhões com resultados bastante variáveis em relação resultados laboratoriais de viabilidade espermática e índices de fertilidade. Em 1979 Martin *et. al*. obtiveram índices de fertilidade de 63% utilizando sêmen de garanhões congelados com o meio diluente a base de Lactose - EDTA - gema de ovo. PAPA *et. al.,* (1993) constataram uma maior eficiência do diluídor a base de Glicina – gema de ovo em comparação ao meio Lactose - EDTA - gema de ovo em parâmetros de motilidade, vigor espermático e integridade do acrossoma. Com a utilização do mesmo diluente, BORGEL (1994) compararam o diluente Lactose - EDTA- gema de ovo com um diluente composto de Glicose - Leite desnatado - gema de ovo, utilizaram sêmen de 72 garanhões e concluíram que o meio diluente a base de EDTA preservou melhor a motilidade pós - descongelação e integridade de acrossoma e associou esta melhoria a ação quelante do EDTA em relação ao cálcio, prevenindo a capacitação precoce dos espermatozóides. Heitland et. al., (1996), avaliou os diluentes de congelação Lactose - EDTA - gema de ovo o diluente a base de leite desnatado, gema de ovo com glicerol, em diferentes protocolos de congelação para sêmen de garanhões e observaram que o meio diluente a base de leite desnatado, gema de ovo com glicerol, foi mais eficiente em preservar a motilidade total e progressiva pós - descongelação, no protocolo de criopreservação que incluiu uma centrifugação a 400g por 15 minutos, a diluição do sêmen no meio de congelação a 23^{o}C em uma concentração de 400 milhões de espermatozóides por ml, refrigeração a 5^{o}C por 2,5 horas, envase em palhetas de 0,5 ml, congelação no vapor de nitrogênio a -160^{o}C e descongelação a 37^{o}C por 30 segundos.

A gema de ovo no meio diluente de criopreservação beneficia os espermatozóides por manter a pressão coloidal do meio e também a lipoproteína de baixa densidade, contida na gema de ovo, estabiliza a membrana espermática durante a congelação e descongelação. (Foulkes,1977;

Watson, 1990). Holt (2000) revisou os aspectos relacionados à congelação de sêmen e relatou que os efeitos crioprotetores da gema de ovo estão envolvidos com a porção lipoprotéica de baixa densidade a qual protege as células espermáticas do choque térmico, da fase de transição dos lipídeos e danos a membrana plasmática a temperaturas abaixo do ponto de congelação da solução. Cabrita *et al.*(1998) observaram que a integridade celular de espermatozóides de truta Arco Íris (*Oncorhynchus Mykiss*) congelados em meio diluente com gema de ovo foram superiores aos espermatozóides, congelados em meio diluente que não continha gema de ovo (38% e 21% respectivamente). Dewit *et al.* (2000) obtiveram taxa de fertilização de oócitos de camundongos, com espermatozóides criopreservados em meio diluente contendo 20% de gema de ovo comparáveis ao sêmen a fresco (68 e 72% respectivamente) e superiores aos outros meios diluentes tradicionais de congelação de camundongos. De Leeuw *et. al.* (1993), concluíram que a gema de ovo desempenha um importante papel na criopreservação de espermatozóides de touros e constataram que a exclusão da gema de ovo dos meios diluentes contendo propanediol, sucrose ou sucrose com polivinilpirrolidone, levou a uma redução da porcentagem de células viáveis durante a refrigeração e congelação.

Bedford *et. al.* (1995) estudaram os efeitos da gema de ovo e do glicerol no sêmen de garanhões e observaram um efeito nocivo da gema de ovo quando em interação com o plasma seminal das amostras refrigeradas a 5^0C no período de 6 a 24 horas de refrigeração, nos parâmetros de motilidade total e progressiva e concluíram que a gema de ovo e o glicerol adicionados ao meio diluente a base de leite desnatado (sem o plasma seminal) não deprimiram a motilidade total ou progressiva do sêmen refrigerado de garanhões, mas agiram adversamente na fertilidade.

Constituintes do leite também desempenham importante papel na criopreservação de espermatozóides. As proteínas do leite exercem um papel na criopreservação semelhante a da gema de ovo. A eficiência dos meios diluentes à base de leite tem sido atribuída à sua composição protéica que atua como tampão e a propriedade quelante frente a metais pesados, havendo relatos de sua parcial proteção contra a redução da temperatura durante o processo de refrigeração (Salamon & Maxwell, 2000). Em estudo visando

determinar os constituintes do leite responsáveis pela proteção dos espermatozóides durante o processo de criopreservação, Batellier *et al*. (1997), estudaram os efeitos dos componentes, fosfocaseinato, *α* - lactoalbumina,, *β* - lactoglobulina e proteínas do soro do leite em comparação ao meios diluente INRA 82, leite desnatado em suas diversas formas (UHT, desnatado, microfiltrado e ultra filtrado) e verificaram que o fosfocaseinato foi o componente do leite mais eficiente em manter a sobrevivência dos espermatozóides de garanhões mantidos a 4^0C e também foi superior (p=0,07) em relação ao INRA 82 quanto a fertilidade (60% e 36%, respectivamente).

Na congelação de espermatozóides de garanhões utilizando os aminoácidos glutamina, prolina, histidina e betaina Trimeche *et al.* (1999), constataram que a glutamina na concentração de 40 mM foi superior (p<0,05) em relação a motilidade quando comparado com o controle sem a adição de aminoácidos no diluente de congelação (56% e 49,7% respectivamente) e glutamina e a prolina nas concentrações de 30 a 80 mM foram similares nos parâmetros de motilidade e velocidade espermática (CASA). Khlifaoui *et. al*, (2005) em estudo onde objetivou avaliar o mecanismo de ação da glutamina como agente crioprotetor na congelação de sêmen de garanhões obtiveram uma melhoria na motilidade computadorizada com a utilização de 50 mM de glutamina no meio diluente de congelação INRA 82 com 2,5% de glicerol e concluiu que a glutamina age sinergicamente com o glicerol no meio extracelular.

Snoeck *et. al.,* (2007), avaliaram a variação dos constituintes do meio diluente Lactose – EDTA-gema de ovo, no que se refere percentual de gema de ovo, açucares e EDTA e concluíram que um acréscimo dos constituintes referidos foi responsável pela melhoria espermática pós descongelação e atribuíram esta melhoria a um aumento da osmolaridade do diluente. Diferenças foram observadas por Roasa *et. al.,* (2007), na taxa de fertilização *in vitro* de ovócitos eqüinos decorrente do meio diluente para congelação utilizado e relacionou esta diferença ao nível de gema de ovo nos diluentes ou seja, o sêmen congelado com o diluente com 21,5% de gema ovo não resultou em fertilização e o meio diluente com 3% de gema de ovo apresentou uma taxa de fertilização de 15% (p<0,05).

Entretanto, dentre os componentes dos diluentes de congelação, os agentes crioprotetores penetrantes, talvez sejam as substâncias que desempenhem um dos papeis mais importantes no processo de criopreservação, exercendo seu mecanismo de ação tanto no meio extracelular como no meio intracelular. Ashwood-Smith (1987) sumarizou diferentes componentes os quais podem ser utilizados como agentes crioprotetores para o congelamento de sêmen, como os álcoois; etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol e poli etilenoglicol, e também as amidas, incluindo a acetamida, formamida, lactamida e bem como o dimetilsulfoxide (DMSO). As características físico-químicas ideais que um agente crioprotetor deve possuir são as seguintes: baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e principalmente uma baixa toxicidade celular (Nash, 1966).

Em diluentes de congelação para sêmen de garanhões os crioprotetores mais comumente utilizados são: o Glicerol, Etilenoglicol, DMSO e as Amidas. Sendo o glicerol o crioprotetor penetrante mais utilizado nos meios de congelação em concentrações de 2 a 5% (Keith, 1999). No entanto, diversos trabalhos têm demonstrado ser este crioprotetor deletério ao espermatozóide de diferentes espécies. Estes efeitos tóxicos do glicerol têm sido reportados por vários autores e revisados por Fahy *et al*., (1990). A toxicidade do glicerol pode resultar em desnaturação de proteínas, alteração de interações da actina e indução da liberação das proteínas do seu local na membrana. Hammerstedt e Graham (1992) revisaram outros efeitos causados pelo glicerol incluindo: mudanças nos eventos citoplasmáticos, devido o aumento da viscosidade intracelular pelo glicerol, alteração da polimerização da tubulina, alteração da associação dos microtubulos, efeitos no balanço bioenergético, alteração direta na membrana plasmática, alteração do glicocálix e proteínas superficiais da célula espermática.

Quedas nas taxas de prenhes foram observadas pelos autores Pace e Sullivan (1975), onde os índices de fertilidade por égua foram mais altas, com inseminações com sêmen diluído em meio diluente sem glicerol (50%) do que sêmen diluído em meio contendo 7% de glicerol (35%). O fator de queda na fertilidade acarretado pela utilização do glicerol também foi evidenciado por Demick *et. al.,*(1976) com a utilização de sêmen refrigerado diluído em meio contendo glicerol por um período de duas horas.

Na busca de crioprotetores alternativos Mercante *et al.,* (1995), estudaram a eficiência *in vitro* do glicerol e etilenoglicol como agentes crioprotetores na congelação de espermatozóides de garanhões e constaram uma similaridade na motilidade e vigor entre os crioprotetores, porém com uma tendência de melhoria com a utilização do etilenoglicol. Neves Neto *et. al.,* (1995), utilizando o glicerol e o etilenoglicol adicionados ao meio de congelação a base de Lactose – EDTA - gema de ovo, na concentração de 5%, na criopreservação de sêmen de garanhões, obtiveram uma taxa de prenhes de 37,5% para o grupo etilenoglicol (3/8) e 12,5% para o grupo glicerol, porém este resultado não foi significativo devido o numero restrito de animais inseminados. A eficácia crioprotetora do etilenoglicol e do glicerol e o método de acondicionamento do sêmen de garanhões (palhetas de 0,5ml e macrotubo de 4ml), em estudo desenvolvido por Alvarenga *et. al.,* (2000), evidenciou uma melhoria na motilidade pós-descongelação ($p<0,05$) com a utilização de etilenoglicol para sêmen de garanhões na concentração de 5% em relação ao glicerol na mesma concentração (36,50% e 34,25%, respectivamente). Chenier *et al.,* (1998) num estudo onde se comparou os efeitos dos crioprotetores (glicerol, etilenoglicol, dietilenoglicol, propilenoglicol e DMSO), concluíram que o etilenoglicol deprimiu a motilidade progressiva dos espermatozóides de garanhões pós - descongelação, comparado com o glicerol ou DMSO e os espermatozóides congelados com dietilenoglicol e propilenoglicol tem uma baixa motilidade e viabilidade do que os outros crioprotetores. No teste de fertilidade, sete éguas das nove inseminadas com sêmen do tratamento DMSO conceberam (78% de taxa de fertilidade). Landim-ALvarenga *et al.* (2001), relataram que o DMSO na concentração de 1,0M foi menos efetivo ($p<0,05$) em relação ao glicerol (0,55M) nos parâmetros de motilidade total e progressiva computadorizada (25,8% e 12,6%, 42,1% e 23,1% respectivamente) e diferenças de resultados similares foram observados em relação à viabilidade celular (citometria de fluxo) e integridade acrossomal (Microscopia eletrônica de transmissão).

O fator que pode elucidar algumas variações entre os crioprotetores, pode basear-se em observações feitas pelo estudo feito por Arruda (2000), onde se evidenciou uma interação entre meio o diluídor de congelação e o crioprotetor, neste estudo utilizou-se os meios de congelação Lactose – EDTA

– gema de ovo, INRA82 e meio a base de leite desnatado e os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. Quando se utilizou o meio diluente Lactose – EDTA - gema de ovo, os crioprotetores não apresentaram diferenças estatísticas entre as avaliações efetuadas, contudo com a utilização dos meios INRA82 e do meio diluente de congelação a base de leite o etilenoglicol apresentou uma tendência de melhoria nos parâmetros avaliados.

Na busca de outras alternativas de substâncias crioprotetoras para congelação do sêmen eqüino, Keith (1998) avaliou varias formas de amidas (formamida, metilformamida, dimetilformamida, acetamida e metilacetamida) como agentes crioprotetores em comparação com o glicerol em meio usado para congelamento de sêmen de garanhões e encontrou que a metilformamida (0,9 M) foi superior em manter o motilidade total dos espermatozóides de garanhões no tempo 0 pós-descongelamento em relação ao glicerol 0,55 M (54,2% a 51,6% respectivamente) e no tempo 20 (min) pós-descongelamento a metilformamida 0,6 M também foi superior ao glicerol 0,55 M (50,6% a 41,7% respectivamente.), em relação a motilidade progressiva a metilformamida 0,9 M no tempo 0 foi superior ao Glicerol 0,55 M (34,8% a 29,4% respectivamente) e no tempo 20 pós-descongelamento metilformamida 0,6 M foi mais eficiente do que o glicerol (30,0% a 23,3% respectivamente) e na preservação da viabilidade celular. Em outro trabalho Alvarenga *et al.* (2000), estudaram a eficácia dos crioprotetores glicerol, etilenoglicol, DMSO e dimetilformamida, e concluíram que o DMSO foi inferior nos resultados de motilidade total e progressiva em relação aos demais tratamentos (42,1% e 23,1%, 40,9% e 22,8%, 25,8% e 12,6%, 50,6% e 22,2% respectivamente). Graham (2000) também obteve resultados de motilidade inferiores ao glicerol ($p<0,05$), utilizando os crioprotetores acetamida, metilacetamida, formamida, metilformamida, dimetilformamida na concentração de 0,55M (60, 8, 20, 5, 40 e 37% respectivamente). No entanto, em um segundo experimento onde se utilizou os crioprotetores etilenoglicol, metilformamida, dimetilformamida nas concentrações de 0,6 e 0,9M em comparação ao glicerol a 0,6M, o crioprotetor metilformamida a 0,9M obteve um resultado em relação a motilidade superior aos demais tratamentos ($p<0,05$).

Em trabalho desenvolvido no Brasil, Medeiros *et. al.*, (2002), avaliaram várias forma de amidas na congelação de sêmen de garanhões em

comparação com o glicerol e observaram um melhorias significativas no parâmetro de motilidade total computadorizada (CASA) com a utilização da dimetilformamida a 5% (v/v). A utilização da metilformamida a 5% e da dimetilacetamida a 3% proporcionou melhores resultados de motilidade progressiva em comparação com os outros crioprotetores. Gomes et. al*.,* (2002), trabalhando com sêmen de garanhões Mangalarga Marchador também obtiveram resultados superiores de Motilidade total computadorizada e integridade de membrana com a utilização da metilformamida e dimetilformamida a 5% (v/v) em comparação ao glicerol. Alvarenga et. al., (2003), em estudo onde objetivou relacionar as variações de congelabilidade entre raças utilizando os crioprotetores dimetilformamida a 5% e glicerol a 5%, constatou num universo de 55 garanhões de diferentes raças, que os parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva (CASA) foram superiores em relação a dimetilformamida na maioria dos garanhões utilizados (40 de 55 indivíduos) e também observou uma melhoria nos parâmetros avaliados em garanhões onde apresentavam uma sensibilidade ao glicerol. Em relação à preservação da integridade acrossomal, Landim – Alvarenga *et al.,* (2005) concluíram que os crioprotetores a base de amidas, principalmente a dimetilformamida e a meilformamida, foram mais eficientes em preservar este parâmetro pós-descongelação em relação ao glicerol em avaliações de microscopia eletrônica e por sondas fluorescentes (FITC-PNA).

Vidament et al. (2002), não observaram diferenças em relação à taxa de fertilidade por ciclo, em éguas inseminadas com sêmen pós-descongelação, onde foram utilizados como crioprotetores glicerol nas concentrações de 2 e 3% e dimetilformamida na concentração de 2% (46, 58, 50% respectivamente), porém neste trabalho foram utilizados garanhões de padrões de congelabilidade superiores.

Com a utilização de sêmen de um garanhão com resultados laboratoriais pós-descongelação insatisfatórios com o glicerol como crioprotetor, Medeiros (2003), em trabalho objetivando avaliar a fertilidade do crioprotetor dimetilformamida em comparação ao glicerol, inseminou 15 éguas com sêmen congelado com dimetilformamida como crioprotetor e 15 éguas com glicerol, obteve um índice de fertilidade com o sêmen congelado com a dimetilformamida de 40% (6/15), com o glicerol nenhuma prenhes foi

constatada. Resultados interessantes foram obtidos por Moffet *et. al.,* (2003), em experimento desenvolvido na Universidade do Colorado nos EUA, no qual foi observado que a despeito de não ter sido observada diferença na motilidade espermática pós descongelamento quando o sêmen foi congelado com DF ou GLI, os índices de fertilidade foram significativamente superiores no grupo de éguas inseminadas com diluente de congelamento contendo DF (47%, 14/30) quando comparado com glicerol (14%, 5/34).

Alvarenga *et. al.,* (2005) relatou que esta característica dos crioprotetores a base de amida, de se adaptarem melhor como agentes crioprotetores ao sêmen de garanhões, que apresentam resultados insatisfatórios com o glicerol, possam estar relacionado à menor viscosidade das amidas em relação ao glicerol resultando em uma maior permeabilidade destes crioprotetores consequentemente diminuindo os riscos de estresse osmóticos nas células espermáticas. Esta observação também foi evidencia por Zanh (2002), observaram resultados melhores e significativos de prenhes (75%) quando utilizaram o meio para congelação de sêmen eqüino MP50 (Papa *et al.,* 2002), com a proporção de crioprotetor de 3% de glicerol e 2% de dimetilformamida comparado com o diluídor M9 (Papa *et al.,* 1998), o qual continha apenas o glicerol a 5%. Neves Neto (2004) também obtiveram resultados positivos na manutenção da viabilidade e fertilidade ao utilizar o MP50, bem como os diluentes BME - Adaptado e FR4 com o crioprotetor dimetilformamida.

Segundo Melo (2005), a associação de glicerol 1% e metilformamida 4% ao diluente Botucrio®, foram eficazes na manutenção da viabilidade espermática na metodologia de congelação usual e na metodologia em que o sêmen é refrigerado por 24 horas antes da congelação. Utilizando o mesmo meio diluente de congelação (Botucrio®) em comparação ao lactose – EDTA e ao diluente INRA 82, Pasquini *et. al.,* (2007), observou que o Botucrio® foi mais eficiente em manter a motilidade total nos tempos de 10 minutos e 60 minutos pós – descongelação.

3.1.3 – Taxa de congelação

A taxa de congelação está diretamente relacionada com a permeabilidade da água da célula, na ausência de agentes crioprotetores cada célula possui uma curva de congelação ideal. (Holt 2000). Uma curva de congelação ideal deve ser lenta o bastante para permitir uma desidratação suficiente da célula espermática para evitar a formação de cristais de gelo intracelular e rápida o bastante para evitar a exposição dos espermatozóides nas soluções hipersaturadas no momento da formação dos cristais de água no ambiente extracelular (Petrunkina 2007).

A formação de gelo faz com que a concentração de solutos na fração não congelada do meio extracelular aumente, elevando a pressão osmótica e causando saída da água do interior das células (Wolfe e Byant, 1999). A faixa critica de temperatura para os espermatozóides é em torno de -3^{o} C e -10^{o} C, nesta faixa de temperatura ocorre à formação de cristais de gelo e liberação do calor latente de fusão, o qual acarreta um aumento de temperatura do sistema e as maiores injurias celulares, devendo nesta faixa, a velocidade de congelação ser o mais rápido possível diminuindo o tempo desta etapa (Watson, 1995)

Fatores isolados ou associados como a quantidade de solutos (crioprotetores no meio de congelação), tipo de envase, tempo e altura em relação ao nível do nitrogênio liquido, a qual as amostras de sêmen são expostas durante a congelação alteram a velocidade de congelação afetando a viabilidade espermática após a descongelação. (Papa *et al.,* 1991; Squires *et. al.* 1999; Tselutin *et. al.,* 1999). Em relação ao método de envase foi demonstrado por Alvarenga *et. al.,* (2000), que amostras de sêmen de garanhões congelados em palhetas de 0,5ml. foram superiores ao macrotubo de 4ml nos parâmetros de motilidade total e integridade ultra-estrutural de acrossoma. Posteriormente, Dell' aqua Jr. *et. al.,* (2001) também obtiveram valores de motilidade total superiores quando utilizaram palhetas de 0,5 e 0,25 ml com sistemas de envase de sêmen eqüino comparado ao macro tubo de 4 ml em relação a integridade de membrana avaliada por sondas fluorescentes. As amostras congeladas em palhetas de 0,25 ml foram superiores aos demais sistemas de envase. Os autores atribuíram os melhores resultados obtidos com

a congelação em palhetas ao fato de que menores volumes congelam de forma mais homogênea.

A comparação entre sistemas de congelação automatizados, na criopreservação de sêmen suíno, utilizados por Thurston *et. al.,* (2003), concluíram que o sistema no qual a taxa de congelação foi de -40^{0}C/minuto foi superior em manter a viabilidade espermática pós-descongelação aos demais sistemas com taxa de congelação em torno de 6^{0}C/minuto e atribuiu estas melhorias na respostas pós-descongelação a taxas de congelação rápidas a qual expõe a célula espermática a um menor tempo na fase de liberação do calor latente durante a formação dos cristais de gelo, o que é extremamente prejudicial à célula espermática. Papa *et. al.,* (2003) num experimento onde foi simulado varias curvas de congelação baseada na altura do sêmen em relação ao nível de nitrogênio (1, 3, 6 e 9 cm), não obtiveram diferenças nos parâmetros pós-descongelação de Motilidade computadorizada (CASA) e integridade de membrana espermática através de sondas fluorescentes. Nesta mesma linha de pesquisa, Vilem (2004) também não observou diferença entre a congelação a 1cm do nitrogênio, com velocidade de congelação de 70^{0}C/minuto, com a congelação a 3 cm do nível do nitrogênio (20^{0}C/minuto), quando do uso da metilformamida e dimetlformamida no meio diluente INRA 82.

A importância da taxa ou curva de congelação na criopreservação de sêmen suíno foi evidenciada em trabalho desenvolvido por Medrano *et. al.,* (2002), os quais investigaram a congelabilidade de sêmen de cachaços em relação à taxa de congelação e constataram que curvas de congelação rápidas são mais eficazes em manter a viabilidade espermática em comparação a curvas lentas e atribuiu a diferença entre a congelabilidade do sêmen dos cachaços utilizados no experimento relacionado a um fator genético ligado a constituição da membrana espermática de cada indivíduo. Em sêmen de garanhões Devireddy et. al., (2002), associaram a permeabilidade da membrana plasmática, com crioprotetores e meios diluentes, com a curva ideal para congelação do sêmen de garanhões e concluíram que curva de congelação entre 29^{o}C por minutos com a utilização do diluente Kenney e curvas em torno de 60^{o}C por minuto em diluente a base de Lactose – EDTA,

permitiram uma desidratação das células espermáticas dentro de seus limites fisiológicos, e foram ideais a congelação de sêmen de garanhões.

Em geral uma taxa de congelação tida como ótima, na maioria das espécies animais, varia entre 30 e 50^0C/minuto, obedecendo a características de protocolos de congelação, variações entre espécies e individuais. Estas curvas de congelação trazem resultados satisfatórios na viabilidade e funcionalidade celular. (Devireddy, *et. al.,* 2004; Thirumala, *et. al*., 2003; Kumar *et. al.,* 2003).

4. MATERIAIS E METODOS

Experimento I - Avaliação da congelabilidade do sêmen de garanhões, quando utilizados os crioprotetores dimetilacetamida, metilformamida, dimetilformamida e glicerol

I – Garanhões

Foram utilizados 27 garanhões de diferentes faixas etárias (5 a 18 anos) das raças Westfallen, Brasileiro de Hipismo, Quarto de Milha, Árabe, Campolina e Mangalarga Marchador, por apresentarem características seminais adequadas ao processo de congelação como: Volume adequado, Concentração maior do que três bilhões de espermatozóides totais no ejaculado, motilidade total acima de 60%, Vigor acima de 3 (escala de 0 a 5), patologia espermática inferior a 40%, e histórico de prenhes relatado por veterinários e proprietários acima de 60%.

Este experimento objetivou selecionar indivíduos, quanto a sua congelabilidade, quando da utilização do glicerol como crioprotetor. Os valores dos parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana dos 27 garanhões utilizados estão dispostos no Anexo 1.

Foram utilizados os parâmetros espermáticos de motilidade total e integridade de membrana pós-descongelação. Garanhões que apresentassem motilidade total acima de 35% e integridade de membrana acima de 20% eram classificados como de congelabilidade aceitável, garanhões que apresentassem sêmen abaixo destes valores eram classificados como de congelabilidade não aceitável. Os garanhões com parâmetros de motilidade total acima de 35% e integridade de membrana abaixo de 20%, ou motilidade total abaixo de 35% e integridade de membrana acima de 20% foram classificados como intermediários.

Para efeito de seleção entre os melhores (Alta Congelabilidade) e piores (Baixa Congelabilidade) garanhões quanto à congelabilidade, nos parâmetros de motilidade total e integridade de membrana, quando da utilização do glicerol, utilizou-se um modelo matemático, o qual incluiu uma análise descritiva dos valores de motilidade total e integridade de membrana de

todos os garanhões. Por não apresentarem uma distribuição normal no teste de normalidade de Kolmogorof-Smirnoff, foram divididos em mediana e quartil, superior e inferior**.** Um esquema simplificado da metodologia aplicada na seleção dos garanhões do Experimento I é demonstrado na Figura 1.

II - Colheita do sêmen

A coleta de sêmen procedeu-se com o auxílio de uma vagina artificial (modelo Biotech Botucatu), sendo então o sêmen filtrado para retirada da porção gel e imediatamente submetido às avaliações acima citadas.

Após as avaliações o sêmen foi diluído na proporção de uma parte de sêmen para uma parte de diluente à base de leite desnatado (Botu - Sêmen®[1]) para centrifugação e posterior congelação.

III - Processamento do sêmen destinado a congelação

Após a diluição do sêmen com o meio de centrifugação (a base de leite desnatado) procedeu-se uma centrifugação com uma força de aproximadamente 600xg por 10 minutos.

Imediatamente após a centrifugação, o sobrenadante (plasma seminal mais o diluente de centrifugação) foi desprezado e os *pellets* (parte concentrada de espermatozóides) ressuspendidos com o diluente de congelamento FR4[2] acrescido dos crioprotetores na concentração de 5% (v/v): Dimetilacetamida[3], Metilformamida[4], Dimetilformamida[5] e Glicerol[6], caracterizando os tratamentos; DA5; MF5, DF5 e GL5 respectivamente, numa concentração espermática de 200 milhões de espermatozóides por ml.

Posteriormente à diluição dos espermatozóides aos diluentes de congelação procedeu-se o envase das amostras em palhetas francesas de 0,5ml devidamente identificadas, sendo estas colocadas sob refrigeração à

[1] Botu – Sêmen – Biotech Botucatu Ltda - Botucatu

[2] FR4 – Nutricell - Campinas

[3] D 4254 – Sigma

[4] M 2769 – Sigma

[5] D 5511 – Sigma

[6] G 4094 – Merck

temperatura de aproximadamente 5^0C por um período de 1 hora. Após esta fase as amostras foram colocadas a 6 cm do nível de Nitrogênio por 15 minutos sendo então mergulhadas em Nitrogênio líquido (Papa *et. al.,*2003) e armazenadas em botijão criobilógico para posterior avaliação.

IV – Análises do sêmen pós-descongelação para classificação dos garanhões quanto à congelabilidade

As amostras após descongelação a 46^OC por 20 segundos (Dell`Aqua Jr, 2001), foram submetidas as seguintes avaliações:

- Análise computadorizada do movimento espermático com o equipamento Hamilton Thorne® (IVOS - 10 Sperm Analyzer, Hamilton Thorne Biosciences Inc., Beverly, MA, USA). Uma alíquota de sêmen após a descongelação foi depositado na câmara de câmara de Makler (Makler Counting Chamber, Lexington, KY, USA) aquecida (38°C) e então introduzida no aparelho. Foram avaliados cinco campos aleatoriamente e anotados os valores de motilidade total e progressiva.

- Teste de integridade de membrana através das sondas fluorescentes Iodeto de propídio* e Carboxifluoresceina** segundo a técnica descrita por Harrison & Vickers (1990) e modificada por Zúccari (1998).

Uma alíquota de sêmen de 10µl foi diluída em 40µl da solução de trabalho (Anexo 6), preparada a partir de uma solução de estoque (Anexo 2).
A avaliação foi realizada com o auxilio de um microscópio de epifluorescência (Leica, DMIRB, Aotec Instrumentos Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com filtro WB e WG sob aumento de 100X (imersão). Foram contadas 200 células em uma mesma lâmina e classificadas como integras e lesadas, conforme sua coloração.

Íntegros = Espermatozóides corados em verde, em toda sua extensão.
Lesados = Espermatozóides corados em vermelho ou parcialmente corados em vermelho.

V – Analise estatística

As comparações entre os indivíduos nos diferentes tratamentos de crioprotetores nos parâmetros espermáticos avaliados, foram efetuadas por analise de variância (ANOVA) e para evidenciar diferenças estatísticas ao nível de significância de 5% utilizou-se o teste de TuKey (SAS, 1989).

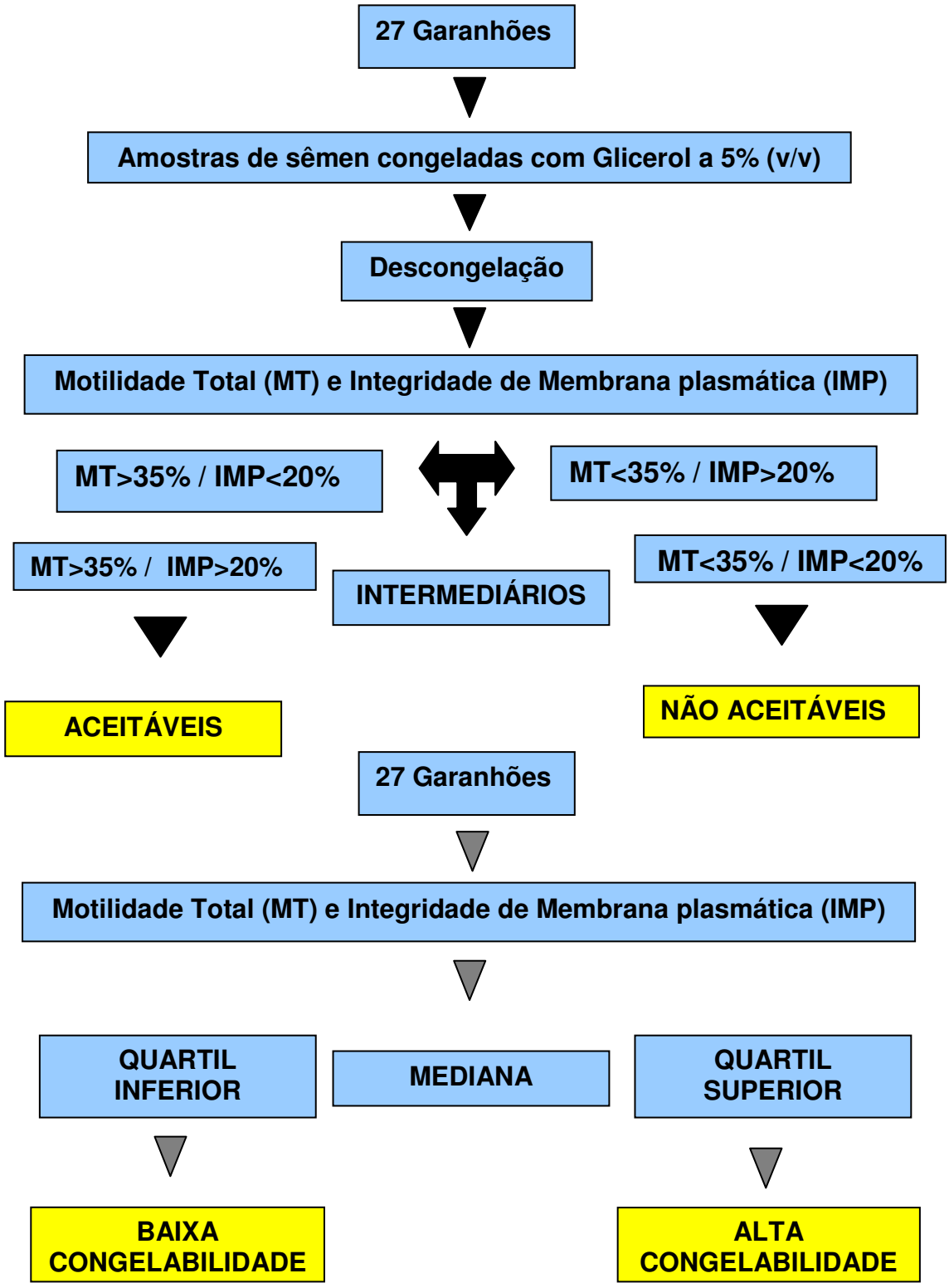


FIGURA 1 – Esquema da metodologia aplicada no Experimento I.

EXPERIMENTO II - Resistência ao estresse osmótico de espermatozóides de garanhões de alta e baixa congelabilidade frente aos diferentes crioprotetores Metilformamida, Dimetilformamida, Dimetilacetamida e Glicerol.

Após a caracterização da congelabilidade dos garanhões no Experimento foram selecionados os garanhões G4, G8, G11 e G14 como pertencentes ao grupo de Alta congelabilidade (sendo este grupo composto por um garanhão da raça Brasileiro de Hipismo e 3 da raça Westfallen) e os garanhões G20, G22, G30, G31, G32 e G33 como grupo de Baixa congelabilidade (indivíduos estes pertencentes à raça Mangalarga Marchador).

I - Colheita, Avaliação e transporte do sêmen

Destes 10 garanhões selecionados, foram coletados dois ejaculados de cada garanhão (20 ejaculados), sendo estes submetidos às avaliações de motilidade óptica, concentração e volume e posteriormente diluídos em meio diluente a base de leite desnatado (Botu sêmen®[7]) na proporção de 3:1 (diluente: sêmen). Após a manipulação sêmen foi acondicionado em um sistema de refrigeração (Botu - Box®[8]), permanecendo em uma temperatura entre 15 e 20^{o}C e transportado ao laboratório em um intervalo de 3 a 4 horas.

II - Teste de Resistência Osmótica

Na chegada ao laboratório o sêmen foi novamente avaliado quanto aos parâmetros de motilidade e concentração sendo utilizado uma quantidade de 2 bilhões de espermatozóides móveis por ejaculado. Posteriormente a alíquota de sêmen contendo 2 bilhões de espermatozóides, foi submetida à centrifugação (600xg/ 10 minutos) e ressuspendida com 4 ml de meio diluente a base de leite desnatado com osmolaridade regulada para 300 mOsm .

Para caracterizar o Grupo Controle uma alíquota de 10µl do sêmen pós-centrifugação e ressuspendido em diluente a base de leite desnatado a

[7] Botu - Sêmen®[1] – Biotech Botucatu Ltda- Botucatu
[8] Botu - Box®[2] - Biotech Botucatu Ltda- Botucatu

300 mOsm, foi submetida às avaliações de Motilidade computadorizada (CASA) e outra alíquota de 150 µl de sêmen às avaliações de integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocôndrial através de microscopia de fluorescência com o protocolo de combinação das sondas: Iodeto de propídio, FITC PSA e JC1.

Posteriormente o volume de 4 ml de sêmen diluído contendo os 2 bilhões de espermatozóides, foi fracionado em quatro tubos (no volume de 1 ml cada tubo, contendo 500 milhões de espermatozóides móveis por tubo). Em seguida foram adicionadas 1ml das soluções contendo os crioprotetores Dimetilacetamida, Dimetilformamida, Metilformamida e Glicerol numa concentração de 2 Molar. Com essa diluição a solução de crioprotetores e sêmen ficaram numa concentração de 1 Molar em um volume de 2 ml e uma concentração de 250 milhões de espermatozóides por ml.

Nesta etapa os espermatozóides foram expostos a uma osmolaridade de 1318 mOsm, 1280 mOsm, 1388 mOsm e 1424 mOs, nos meios contendo a concentração de 1 Molar dos crioprotetores; Dimetilacetamida, Metilformamida, Dimetilformamida e Glicerol, respectivamente.

Os espermatozóides foram incubados por 10 minutos nas diferentes soluções de crioprotetores e após este período uma alíquota de cada tratamento foi submetida a avaliações descritas anteriormente.

Após a incubação nas soluções hiperosmóticas dos diferentes crioprotetores, os mesmos foram diluídos em solução a base de leite desnatado a 300mOsm na proporção de 6:1 (solução a 300mOsm: solução a 1 Molar dos diferentes crioproetores), no intuito de retornar a isosmolaridade (300 mOsm), sendo então novamente incubada a 10 minutos e submetidas as avaliações anteriormente citadas. Um esquema da metodologia aplicada no Experimento II esta demonstrado na Figura 3.

III – Avaliações de Motilidade espermática computadorizada

As amostras foram avaliadas pelo equipamento Hamilton Thorne® (IVOS - 10 Sperm Analyzer, Hamilton Thorne Biosciences Inc., Beverly, MA, USA). Uma alíquota de sêmen foi depositada na câmara de câmara de Makler

(Makler Counting Chamber, Lexington, KY, USA) aquecida (38°C) e então introduzida no aparelho. Foram avaliados cinco campos aleatoriamente, onde foram selecionados cinco campos, aleatoriamente, por amostra. Foram avaliados os seguintes parâmetros espermáticos:

- Motilidade total
- Motilidade progressiva
- Percentual de espermatozóides rápidos
- Percentual de Linearidade espermática

IV - Protocolo de análise da integridade da membrana espermática, acrossomal e função mitocôndrial através de sondas fluorescentes.

Foram utilizadas a associações de sondas Iodeto de Propídio (28,707-5, sigma) para avaliação da membrana espermática, FITC-PSA (L-0770, sigma) para integridade de membrana acrossomal e JC-1 (T3168, Molecular Probes) para função mitocôndrial, segundo a técnica descrita por CELEGHINI (2005). Anexo - 3.

As análises foram realizadas com o auxilio de um microscópio de epifluorescência (Leica, DMIRB, Aotec Instrumentos Científicos Ltda., São Paulo, SP, Brasil), com filtro WB e WG sob aumento de 100X (imersão). Foram contadas 200 células em uma mesma lâmina.

Com o objetivo de avaliar a integridade da membrana plasmática e acrossomal e função mitocôndrial, os espermatozóides foram classificados em oito grupos, conforme sua coloração (Exemplificados na FIGURA 2):

1. Espermatozóide com a região da cabeça corada em verde apresenta membrana plasmática integra, o acrossoma intacto apresenta-se não corado e peça intermediaria (mitocôndrias), corada de laranja a vermelho, representa alto potencial de membrana mitocôndrial.

2. Espermatozóide com membrana integra (verde), com acrossoma intacto (não corado) e baixo potencial de membrana mitocôndrial (peça intermediaria corada de verde).

3. Espermatozóide com membrana plasmática (verde), com acrossoma lesado (corado de verde) e alto potencial de membrana mitocôndrial (peça intermediária coradas de vermelho).

4. Espermatozóide com membrana plasmática integra (verde) com acrossoma lesado (corado de verde) e potencial de membrana mitocôndrial baixo (peça intermediaria corada de verde).

5. Espermatozóide com membrana plasmática lesada (corado de vermelho), com acrossoma intacto (não corado) e alto potencial de membrana mitocôndrial (peça intermediaria corada de laranja a vermelho).

6. Espermatozóide com membrana plasmática lesada (corado de vermelha), com acrossomo intacto (não corado) e potencial de membrana mitocôndrial baixo (peça intermediaria corada de verde).

7. Espermatozóide com membrana plasmática lesada (corada de vermelho), com acrossoma lesado (corado de verde) e potencial de membrana mitocôndrial alto (corado de laranja a vermelho).

8. Espermatozóide com membrana plasmática lesada (corada em vermelho) com acrossoma lesado (corado em verde) e potencial de membrana mitocôndrial baixo (peça intermediaria corada de verde)

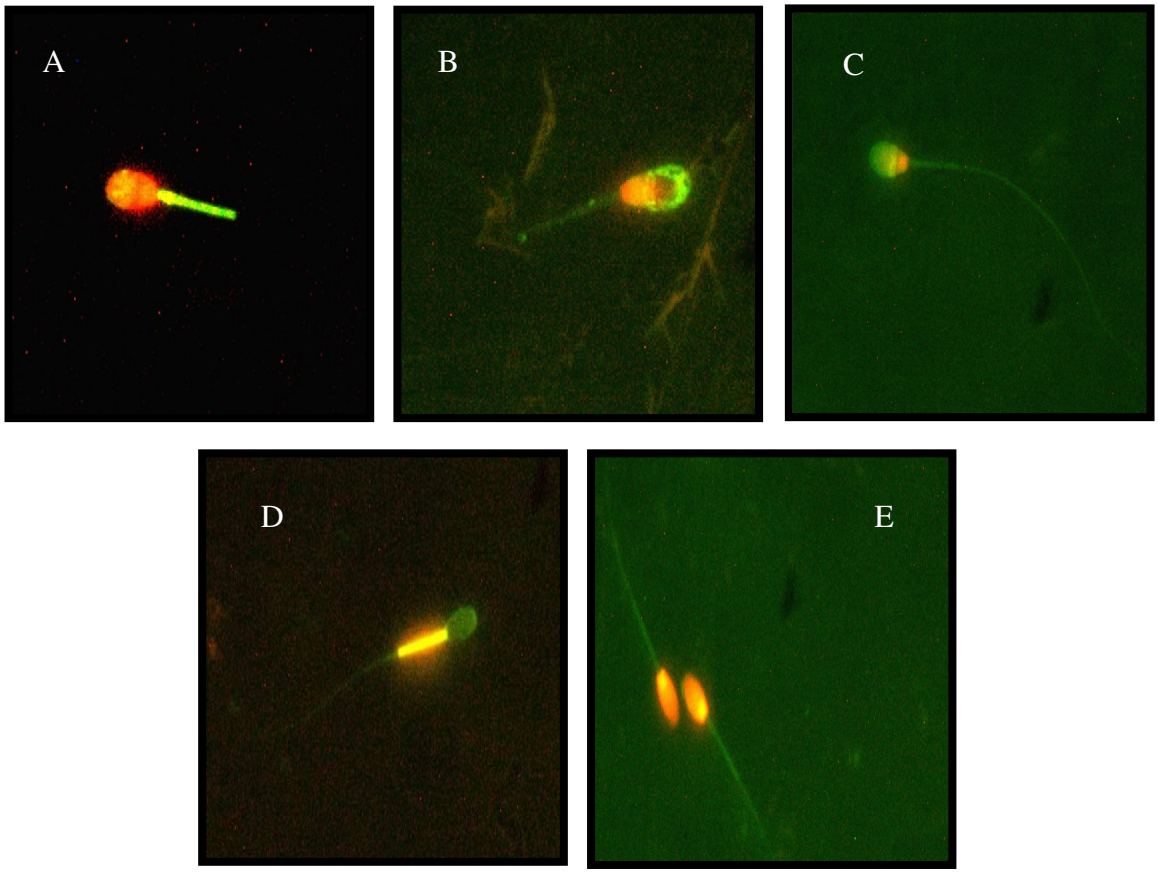


Figura 2 – A: Célula espermática com membrana plasmática lesada, membrana acrossomal íntegra e alta função mitocôndrial; B e C: Células espermáticas com membrana plasmática e acrossomal lesadas e baixa função mitocôndrial; D: Célula espermática com membrana plasmática e acrossomal íntegras e alta função mitocôndrial; E: Células espermáticas com membrana plasmática lesada, membrana acrossomal íntegra e baixa função acrossomal.

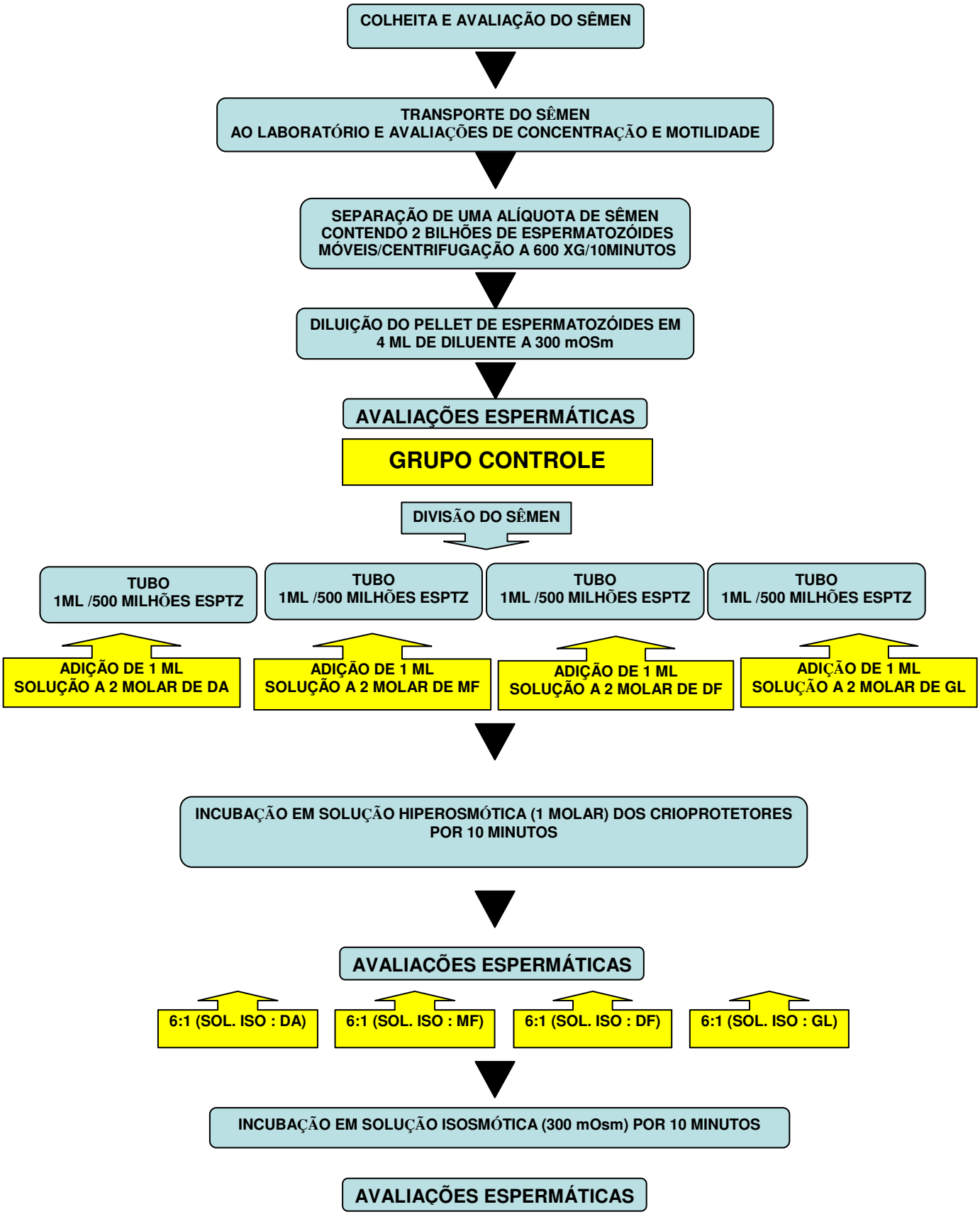


FIGURA 3 – Esquema da metodologia aplicada no Experimento II.

V – Analise estatística

As comparações entre os diferentes tratamentos de crioprotetores nos parâmetros espermáticos avaliados, foram efetuadas por analise de variância (ANOVA) e para evidenciar diferenças estatísticas ao nível de significância de 5% utilizou-se o teste de TuKey (SAS, 1989).

EXPERIMENTO III – Efeito do estresse osmótico, induzido por diferentes crioprotetores sobre a fertilidade do sêmen fresco de garanhões de alta e baixa congelabilidade.

I – Garanhões

Para a realização do teste de fertilidade do sêmen fresco submetido ao estresse osmótico, selecionou-se um garanhão de alta congelabilidade (G11) da raça Westfallen e um garanhão de baixa congelabilidade (G33) da raça Mangalarga Marchador. Na primeira estação de monta compreendida de Outubro de 2004 a Abril de 2005 foi utilizado o garanhão G 11, na segunda estação de monta compreendida de Outubro de 2005 a abril de 2006 utilizou-se o garanhão G33.

II - Colheita, processamento do sêmen e padronização das doses inseminantes

A colheita e o processamento do sêmen procedeu-se como no Experimento II, sendo as doses inseminantes compostas do sêmen centrifugado e ressuspendido em solução a base de leite desnatado a 300 mOsm (grupo controle) e sêmen submetido ao estresse osmótico, com os diferentes tratamentos de crioprotetores. O volume padrão da dose inseminante foi de 15 ml e concentração de 500 milhões de espermatozóides.

III – Inseminação Artificial

Foram utilizadas um total de 25 éguas de raças variadas, com idades entre 5 a 10 anos em perfeitas condições de saúde geral e reprodutiva, mantidas em regime de pasto com suplementação de concentrado e sal mineralizado. Foram utilizados 125 ciclos para cada garanhão, sendo inseminados 25 ciclos como grupo controle e 25 ciclos com cada um dos crioprotetores Dimetilacetamida, Metilformamida, Dimetilformamida e Glicerol totalizando 125 ciclos. Esta distribuição dos ciclos permitiu que cada égua fosse inseminada uma vez com o controle e uma vez com cada crioprotetor, totalizando 5 ciclos por égua.

Após a constatação do cio, as éguas foram monitoradas diariamente através de palpação retal e ultra-sonografia, com a detecção de um folículo de 35 mm e bom edema uterino, foram administrados Extrato de Pituitária Eqüina na dose de 10mg como agente indutor de ovulação (Medeiros *et. al.* 2005)

As éguas foram inseminadas após 36 a 40 horas da indução da ovulação e o diagnóstico de prenhes foi realizado com auxilio de ultra-som após 12 a 15 dias da ovulação. Após a detecção ou não da prenhes foi administrado uma dose de 5 mg de dinoproste (Lutalise®) intra-muscular, para induzir a luteólise e o retorno do cio novamente.

IV – Analise estatística

As comparações entre as taxas de fertilidade nos diferentes grupos foram efetuadas através do Teste de Fisher com significância de 5% (SAS, 1989).

5. RESULTADOS

EXPERIMENTO I - Avaliação da congelabilidade do sêmen de garanhões quando utilizados os crioprotetores dimetilacetamida, metilformamida, dimetilformamida e glicerol

Observou-se uma superioridade ($p<0,001$) dos tratamentos amidas (DA5, MF5 e DF5) em relação ao glicerol nas variáveis de motilidade total, sendo o tratamento DA5 inferior às demais amidas e superior ao GL5 nos 27 garanhões avaliados. Nos resultados de motilidade progressiva computadorizada o tratamento MF foi superior ($p<0,001$) aos demais tratamentos, o tratamento DF5 superior ao DA5 e este ao GL5. Quanto à integridade de membrana as amidas apresentaram resultados superiores ao glicerol ($p<0,001$). Tabela 1 e Gráfico 1.

Baseados nos resultados de motilidade total e integridade de membrana espermática pós – descongelação deste experimento os garanhões foram classificados como indivíduos de congelabilidade aceitável e não aceitável. Gráfico 2.

Dos 27 garanhões nove deles foram classificados como de congelabilidade aceitável (G2, G3, G4, G6, G7, G8, G11, G13 e G14) e doze como de congelabilidade não aceitável (G10, G15, G16, G20, G22, G23, G25, G30, G31, G32, G33, G34) os demais 6 Garanhões (G1, G5, G9, G12, G21 e G26), se enquadraram em um grupo intermediário.

Entre os garanhões de congelabilidade aceitável não se observou diferença em relação à motilidade total entre os crioprotetores ($p>0,05$), porém no parâmetro de integridade de membrana as amidas foram superiores ao glicerol, sendo o tratamento com MF5 superior aos demais ($p=0,027$). Tabelas 2 e Gráfico 3.

No grupo de garanhões classificados como de congelabilidade não aceitável os tratamentos amidas foram superiores ao glicerol, nos parâmetros de motilidade total e integridade de membrana, sendo o tratamento DF5 superior aos demais nestes parâmetros ($p<0,001$). Tabela 3 e Gráfico 4.

No intuito de selecionar a população de indivíduos que apresentassem uma maior resistência ao congelamento baseado na resposta pós - descongelação, utilizando o glicerol como crioprotetor, foram selecionados indivíduos que apresentassem motilidade total computadorizada superior a 50% e integridade de membrana superior a 27,5%, enquadraram-se neste grupo 4 animais (G4, G8, G11 e G14) tendo sido estes classificados como de Alta Congelabilidade. Neste grupo de animais os quais, não se observou uma diferença entre os tratamentos amidas em relação ao tratamento glicerol para nos parâmetros motilidade total e progressiva computadorizada ($p>0,005$). Quanto ao parâmetro de integridade de membrana também não ocorreu diferenças entre os tratamentos amidas e o glicerol. Tabela 4 e Gráfico 5 e 6.

Foram classificados como de Baixa Congelabilidade o grupo de animais com motilidade total computadorizada abaixo de 6,25 % e integridade de membrana inferior a 9,5% utilizando o tratamento GL5, os quais se enquadraram os garanhões G20, G22, G30, G31, G32 e G33. Neste grupo também não se observou diferença entre os tratamentos amidas nos parâmetros de motilidade total e integridade de membrana, porém os resultados destes tratamentos em relação ao glicerol foram altamente significativos. Tabela 5 e Gráfico 5 e 6.

As Figuras 4 e 5 ilustram o esquema de seleção dos garanhões segundo os parâmetros de motilidade total e integridade de membrana tendo com referencia o tratamento GL5.

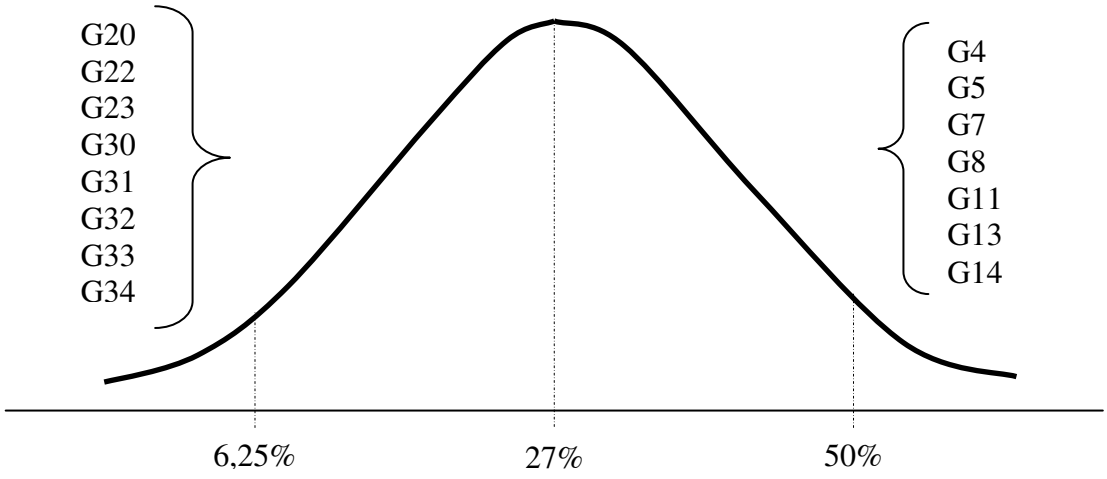


FIGURA 4 - Ilustração da curva, com mediana, para distribuição da motilidade total do tratamento com glicerol incluindo a seleção dos garanhões pertencentes ao quartil superior e inferior.

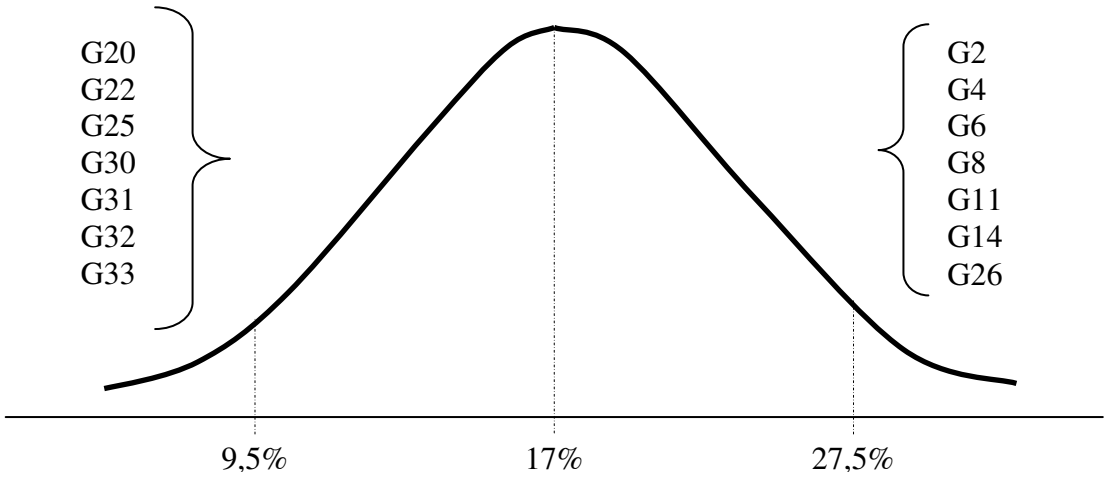


FIGURA 5 - Ilustração da curva, com mediana, para distribuição da integridade de membrana do tratamento com glicerol incluindo a seleção dos garanhões pertencentes ao quartil superior e inferior.

TABELA 1 - Média em porcentagem e Desvio Padrão dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) computadorizada e integridade de membrana plasmática (IMP) em comparação aos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%), de diferentes garanhões (n=27).

Parâmetros	DA	MF	DF	GL
MT	$44 \pm 22,6^{b}$	$52,5 \pm 21,5^{a}$	54 ± 20^{a}	$30,6 \pm 25,1^{c}$
MP	$13,1 \pm 9,8^{c}$	$20,3 \pm 11,10^{a}$	$17 \pm 10,7^{b}$	$12,8 \pm 10,7^{c}$
IMP	$30,7 \pm 13,7^{a}$	$36 \pm 13,3^{a}$	$34 \pm 12,9^{a}$	$18,6 \pm 13^{b}$

[abc] Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente p<0,001.

TABELA 2 - Média em porcentagem e Desvio Padrão dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) computadorizada e integridade de membrana plasmática (IMP) em comparação aos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%), de garanhões de congelabilidade aceitável (n=9).

Parâmetros	DA	MF	DF	GL
MT	53 ± 22,5	69 ± 12,2	65,3 ± 12,6	56 ± 13,4
MP	$18 \pm 10,5^{d}$	$28,5 \pm 9,5^{a}$	$22,4 \pm 9^{c}$	$22,5 \pm 5,7^{b}$
IMP	$36,7 \pm 15,5^{c}$	$50,3 \pm 8,6^{a}$	$41,3 \pm 16,5^{b}$	$33,6 \pm 6,6^{d}$

[abcd] Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente p<0,05.

TABELA 3 - Média em porcentagem e Desvio Padrão dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) computadorizada e integridade de membrana plasmática (IMP) em comparação aos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%), de garanhões de congelabilidade não aceitável (n=12).

Parâmetros	DA	MF	DF	GL
MT	$33,5 \pm 20,5^{c}$	$35,4 \pm 17,6^{b}$	$41,3 \pm 19,8^{a}$	$9 \pm 10,7^{d}$
MP	$8,5 \pm 6,2^{c}$	$12 \pm 7,1^{a}$	$12,2 \pm 7,4^{b}$	$4,5 \pm 7,1^{d}$
IMP	$26,5 \pm 13,8^{c}$	$28,1 \pm 7,7^{b}$	$28,4 \pm 8,4^{a}$	$7,33 \pm 5,9^{d}$

^{abc} Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente $p<0,001$.

TABELA 4 – Média em porcentagem e Desvio Padrão dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) computadorizada e integridade de membrana plasmática (IMP) em comparação aos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%), dos garanhões de alta congelabilidade (n=4).

Parâmetros	DA	MF	DF	GL
MT	68 ± 11,8	75,7± 13,7	71,5 ± 10,2	62,5 ± 12,7
MP	24 ± 5,7	32 ± 12,3	27,7± 6,4	23,2± 6,1
IMP	38,7± 15,6	45,7 ± 8,1	40,7± 12,2	37,7 ± 1,2

TABELA 5 – Média em porcentagem e Desvio Padrão dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) computadorizada e integridade de membrana plasmática (IMP) em comparação aos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%), dos garanhões de baixa congelabilidade (n=6).

Parâmetros	DA	MF	DF	GL
MT	31,8 ± 25,1[a]	33,1 ± 14,3[a]	35,5 ± 20,7[a]	1,5 ± 2,34[b]
MP	7,1± 6,7[ab]	9,8 ± 5,4[a]	8 ± 6,8[ab]	0,33 ± 0,81[abc]
IMP	27,5 ± 13,8[a]	30 ± 8,5[a]	28,3 ± 10,8[a]	2 ± 0, 63[b]

[abc]Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente p<0,0001

GRÁFICO 1 – Comparação dos parâmetros de motilidade total e integridade de membrana espermática pós-descongelação entre os garanhões de congelabilidade aceitável e não aceitável, segundo os diferentes tratamentos.

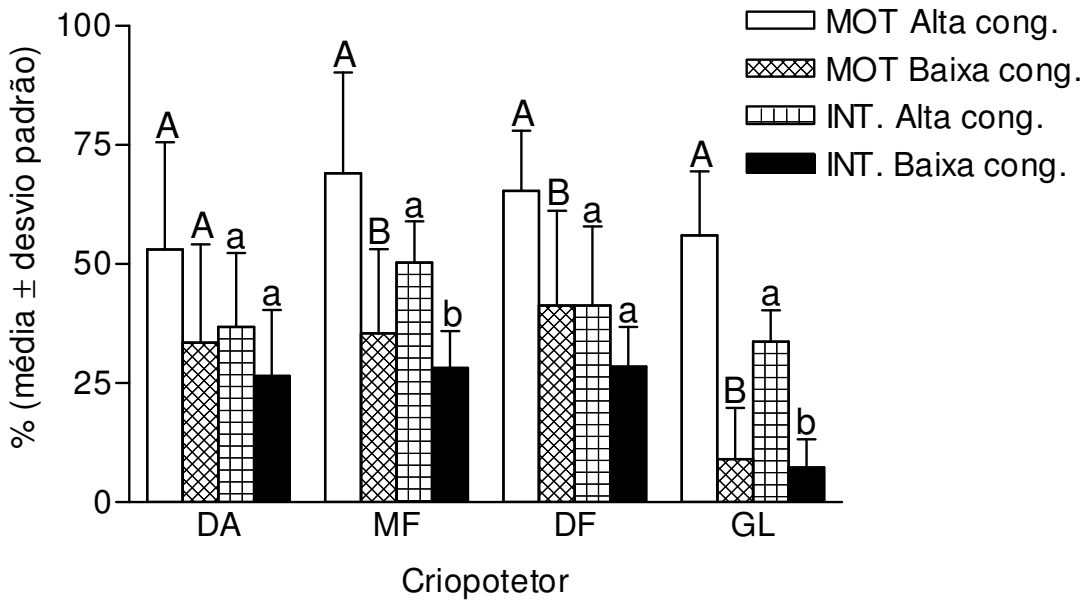


GRÁFICO 2 - Comparação dos parâmetros de Motilidade Total e Integridade de Membrana espermática pós-descongelação entre os garanhões de congelabilidade aceitável e não aceitável.

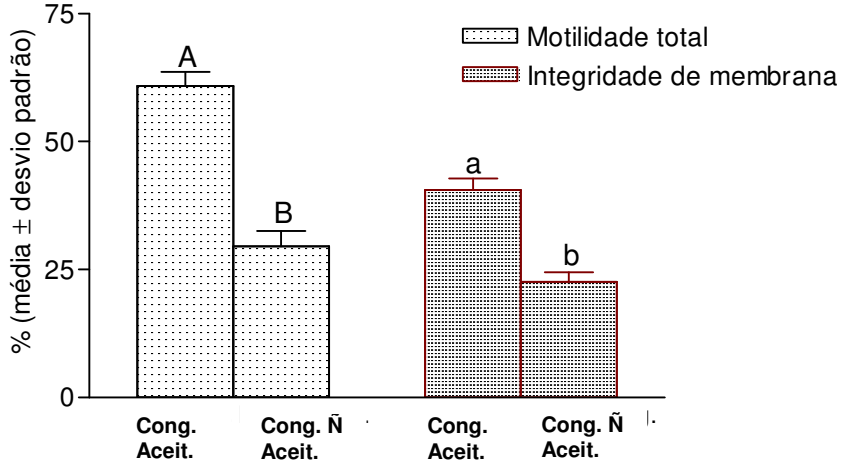


GRAFICO 3 - Comparação dos parâmetros de motilidade total e integridade de membrana espermática pós-descongelação entre os garanhões de congelabilidade aceitável, segundo diferentes tratamentos.

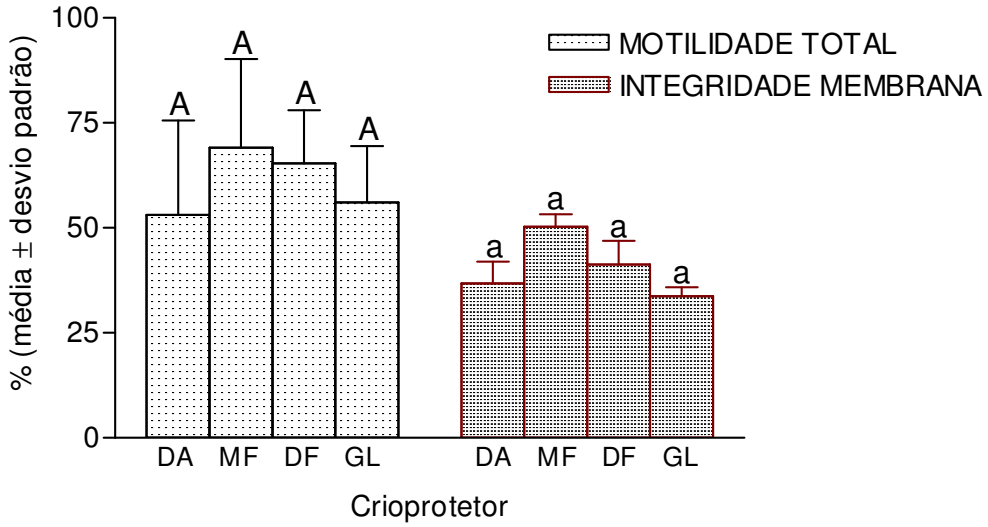


GRAFICO 4 - Comparação dos parâmetros de motilidade total e integridade de membrana espermática pós-descongelação entre os garanhões de congelabilidade não aceitável, nos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%).

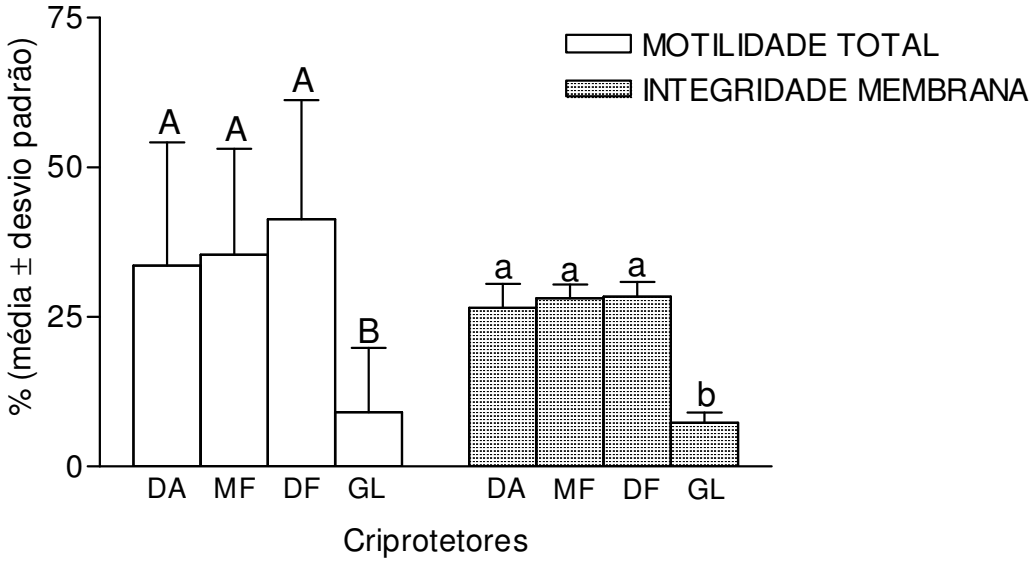


GRAFICO 5 – Comparação entre garanhões de Alta (n=4) e Baixa congelabilidade (n=6) no parâmetro de motilidade total espermática pós-descongelação nos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%)

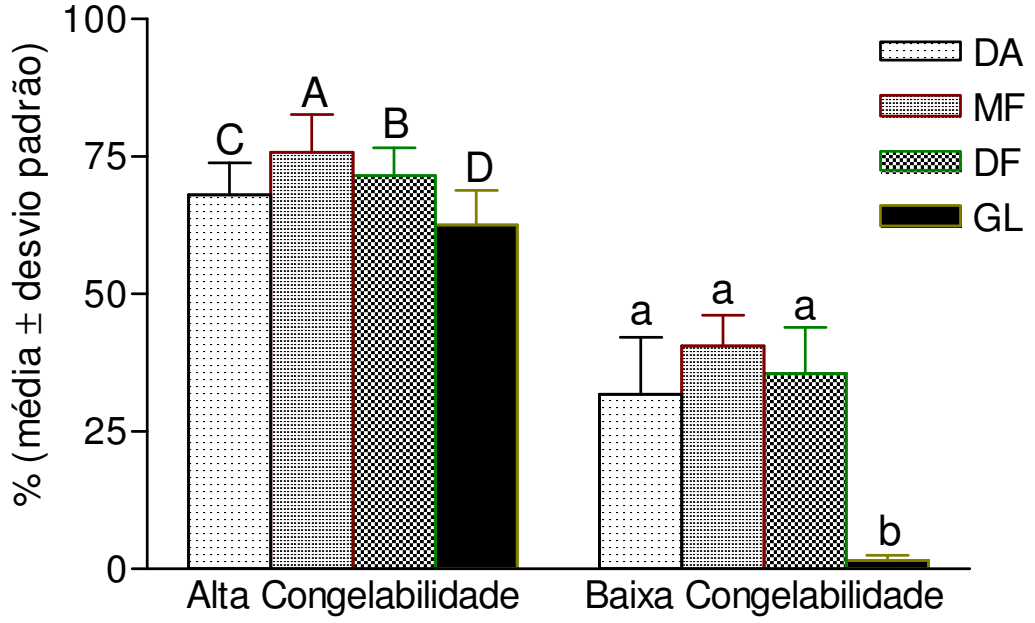
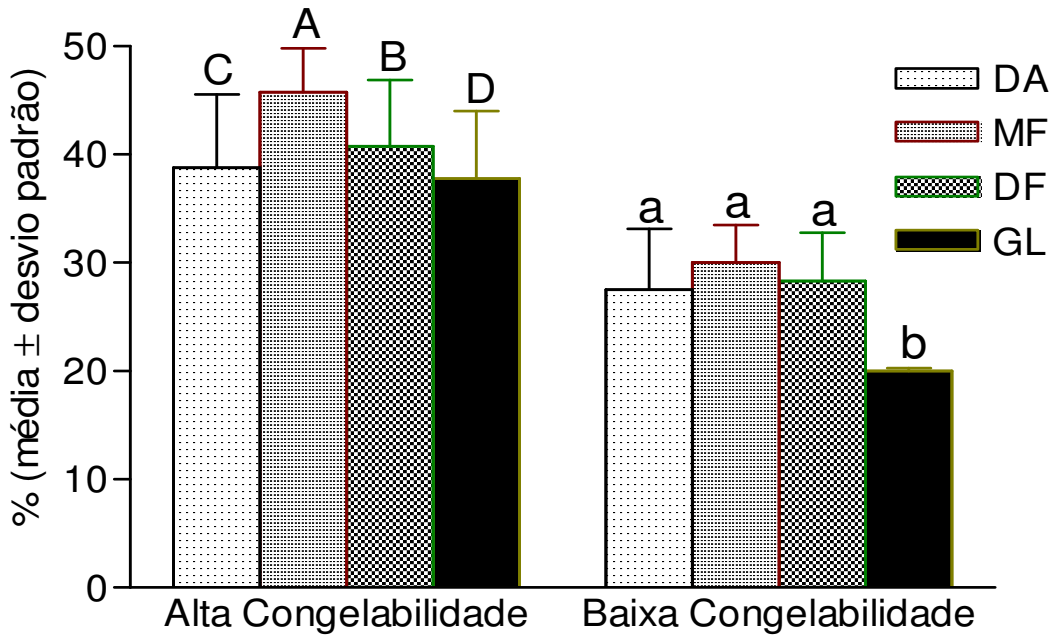


GRAFICO 6 – Comparação entre garanhões de Alta (n=4) e Baixa (n=6) congelabilidade quanto as médias de Integridade de membrana espermática pós-descongelação nos tratamentos DA (dimetilacetamida a 5%), MF (metilformamida a 5%), DF (dimetilformamida a 5%) e GL (glicerol a 5%)



II – EXPERIMENTO II

Os resultados dos parâmetros espermáticos de motilidade total computadorizada, entre os 10 garanhões de alta e baixa congelabilidade, utilizados no experimento, apresentaram uma queda na motilidade total quando os espermatozóides foram expostos às soluções hiperosmóticas (1Molar), nos diferentes tratamentos em relação ao controle. Sendo esta característica mais evidente no tratamento DA. O tratamento MF foi superior frente aos demais porem inferior ao controle ($p<0,001$). No parâmetro de motilidade progressiva também ocorreu um decréscimo dos valores em relação ao controle, como na motilidade total o tratamento DA apresentou um valor inferior aos demais tratamentos e o MF5 superior aos demais tratamentos ($p<0,001$).

No percentual de espermatozóides rápidos os resultados entre os tratamentos de crioprotetores foram inferiores ao grupo controle, sendo tratamento MF superior aos demais. O tratamento DA5 foi inferior, aos demais tratamentos e o tratamento GL superior ao DF ($p<0,001$).

Quanto à integridade de membrana observou-se uma queda dos resultados de todos os tratamentos frente ao controle, porém as amidas foram superiores ao tratamento glicerol e entre as amidas o tratamento DF foi superior às demais ($p<0,001$). Nos resultados de potencial de membrana mitocôndrial observou-se uma queda dos índices em relação ao grupo controle, porem não houve diferença entre os tratamentos. Tabela 6.

Quando as amostras dos diferentes tratamentos expostas em condições de isosmolaridade, ocorreu um decréscimo de todos os valores dos parâmetros avaliados em comparação ao controle. Na motilidade total não houve diferença entre os tratamentos amidas, porém estes se mostraram superiores ao GL5 ($p<0,001$). Em relação à motilidade progressiva o tratamento MF apresentou-se superior a todos os tratamentos e não houve diferença significativa entre os demais ($p<0,001$).

No percentual de rápidos o grupo controle foi superior aos crioprotetores e os tratamentos amidas superiores ao glicerol ($p<0,001$).

Nas avaliações de integridade de membrana plasmática e acrossomal ocorreu uma diminuição no percentual de células integras em relação ao grupo controle, porém os tratamentos amidas se mostraram superiores ao glicerol. Observou-se uma diminuição dos resultados do potencial de membrana mitocôndrial, dos diferentes crioprotetores em relação ao controle ($p<0,001$), no entanto entre os tratamentos não houve diferença (Tabela 7).

Na avaliação do estresse osmótico dos garanhões de alta congelabilidade os resultados são apresentados nas Tabelas 8 e 9. Quando os espermatozóides foram expostos nas soluções hipertônicas a 1 Molar dos diferentes crioprotetores ocorreu um decréscimo da motilidade total em relação ao controle, o crioprotetor MF apresentou-se superior aos demais tratamentos, não foram observadas diferenças entre os tratamentos DF e GL ($p>0,005$),

sendo tratamento DA, o que apresentou uma maior queda de motilidade em comparação aos demais tratamentos (P<0,001).

Em relação à manutenção da motilidade progressiva os crioprotetores MF, DF e GL, foram superiores ao tratamento DA, porem inferiores ao controle. Em relação à percentagem de espermatozóides rápidos, observou-se um decréscimo dos resultados nos diferentes tratamentos em relação ao controle, sendo o tratamento MF superior aos demais. (p<0,001).

Quando avaliado o parâmetro de integridade de membrana plasmática o tratamento DF foi superior aos demais, sendo o MF5 superior ao GL5 e ao DA5 (p<0,001). No potencial de membrana mitocôndrial não houve diferença entre o tratamento DF5 e o controle, o tratamento MF5 foi semelhante ao GL5 e o tratamento DA5 inferior a todos os tratamentos (p<0,001) - Tabela 8.

Quando do retorno na condição de isosmolaridade a motilidade total dos tratamentos amidas, foram superiores ao tratamento glicerol, porém inferiores ao controle (p<0,001), Quanto à motilidade progressiva os diferentes tratamentos apresentaram valores inferiores ao controle, sendo o tratamento MF superior aos demais tratamentos, os tratamentos DA5 e DF5 não apresentaram diferenças estatísticas entre si, porém foram superiores ao GL5. No percentual de linearidade espermática não foi observado diferenças entre os crioprotetores e o controle, no percentual de espermatozóides rápidos todos os tratamentos apresentaram valores inferiores em relação ao controle, no entanto as amidas obtiveram valores superiores em relação ao glicerol. Nos parâmetros de integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocôndrial as amidas foram superiores ao tratamento glicerol, porém inferiores ao controle (p<0,001), dados estes apresentados na Tabela 9.

No grupo de garanhões de baixa congelabilidade, quando os espermatozóides foram expostos nas soluções hipertônicas a 1 Molar, também resultou em uma diminuição da motilidade total em relação ao controle, o tratamento DA apresentou uma maior diminuição neste parâmetro, o tratamento MF foi superior aos demais tratamentos, seguido dos tratamentos DF e GL. (p<0,001). Quanto a motilidade progressiva não houve diferença entre os crioprotetores (p>0,05), porém estes apresentaram-se inferiores ao controle (p<0,001).

No percentual de espermatozóides rápidos todos os tratamentos foram inferiores ao controle e o MF, foi superior aos demais tratamentos ($p<0,001$). Em relação à integridade de membrana plasmática o tratamento DA foi superior aos demais tratamentos, sendo estes inferiores ao controle. No potencial de membrana mitocôndrial o controle foi superior a todos os crioprotetores($p<0,001$). Tabela 10.

Em condições de isosmolaridade, a motilidade total entre as amidas forma semelhantes ao controle e superiores ao GL. Em relação à motilidade progressiva o MF5 não diferiu em relação ao controle e foi superior aos demais tratamentos. No percentual de espermatozóides rápidos os tratamentos amidas não diferiu ao controle e foram superiores ao glicerol ($p<0,0001$).

Quanto à integridade de membrana plasmática os tratamentos amidas foram superiores ao GL5 ($p<0,001$) e inferiores ao controle. Na integridade acrossomal os resultados foram semelhantes ao da integridade de membrana. Em relação ao potencial de membrana mitocôndrial os grupos amidas semelhantes ao controle ($p>0,05$) e superiores ao glicerol ($p<0,001$) - (Tabela 11).

Tabela 6 – Média em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +) de espermatozóides de garanhões expostos ao estresse osmótico em soluções a 1 Molar dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL). (n=10 garanhões/ 20 ejaculados)

Parâmetros	Controle	DA	MF	DF	GL
MT	81,4 ± 9,1^{a}	12,9± 15,2^{d}	61,5 ± 16,1^{b}	44,6± 22,6^{c}	41,7± 24,2^{c}
MP	36,8± 13,2^{a}	3,4± 4^{c}	13,2± 10,2^{b}	8,2± 12,1^{bc}	10± 8,3^{bc}
LIN	43,4± 6,2	40,4 ± 19,9	38,5 ± 5,5	39,7± 7,1	43,3 ± 6,6
RAP	74,4± 12,5^{a}	6,9± 8,1^{d}	30,93 ± 18^{b}	13,6 ± 11,4^{cd}	19,2± 19,6^{c}
IMP	61,8± 13,6^{a}	48,4± 9,4^{bc}	49,2± 8,4^{bc}	53± 12^{b}	42,3± 12,1^{c}
IAC	86,2± 5,6	84,8± 7,9	89,2± 5,4	85,7± 8,4	85,2 ± 9,9
PMM +	61 ± 12,4^{a}	39,2 ± 15,4^{b}	43± 13,9^{b}	48,5 ± 18,3^{b}	43,2± 14,8^{b}

^{abcd}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p<0,001$)

Tabela 7 – Média em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +), dos espermatozóides de garanhões em solução isosmótica, após serem submetidos ao estresse osmótico nas soluções hiperosmóticas dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL). (n=10 garanhões/ 20 ejaculados).

Parâmetros	Controle	DA	MF	DF	GL
MT	81,4±9,1 [a]	66,3±15[b]	72,8±11,4[b]	66,7±13,4[b]	43,3±24,5[c]
MP	36,8±13,2[a]	19,6±11,5[c]	28,4±12,4[b]	22,8±11,1[c]	16,6±11,8[c]
LIN	43,4±6,2	35,3±4	39,2±2,6	37,3±3,3	40,3±13,8
RAP	74,4±12,5[a]	50,8±20,4[b]	55,4±17,8[b]	53±16,7[b]	24,4±19,8[c]
IMP	61,8±13,8[a]	37,6±9,4[b]	40,4±8,4[b]	38,1±1,6[b]	22±13,4[c]
IAC	86,2±5,6[a]	69±11,8[b]	71±12,2[b]	68,3±13,7[b]	49,5±13,9[c]
PMM +	61±12,4[a]	56,5±9,5[a]	57,2±8,9[a]	59±10,6[a]	43,6±10,6[b]

[abc]Médias seguidas de letras na mesma linha diferentes diferem estatisticamente (p<0,001)

Tabela 8 - Média em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +) dos espermatozóides de garanhões de alta congelabilidade expostos ao estresse osmótico em soluções a 1 Molar dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL). (n=4 garanhões/ 8 ejaculados)

Parâmetros	Controle	DA	MF	DF	GL
MT	84,5 ± 7,4^{a}	13,5 ± 16,9^{d}	66 ± 8,6^{b}	48,2 ± 22^{c}	48,9± 22,7^{c}
MP	35,9 ± 11^{a}	3,4± 4,5^{c}	13± 10^{b}	10± 13,7^{bc}	12,4 ± 8,3^{b}
LIN	42,8± 4,6	37,9 ± 14,7	37,9 ± 5,9	38 ± 3,53	41,4 ± 6,6
RAP	78,7± 9,8^{a}	6,4 ± 9,2^{d}	27,6± 13,7^{b}	13,9 ± 12,4^{cd}	23,5 ± 21^{bc}
IMP	66± 13,5^{a}	50,2 ± 9^{d}	52,6± 6,1^{c}	57 ± 11,3^{b}	46,3± 10,6^{d}
IAC	87,1 ± 5,1	88,2± 3,2	90,6± 2,1	88,8 ± 3	89,2± 5,4
PMM +	66,4± 9,4^{a}	46± 11^{c}	50 ± 7,3^{b}	57,8± 10^{a}	50,2 ± 8,6^{b}

^{abcd} Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p<0,05$)

Tabela 9 - Média em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +), dos espermatozóides de garanhões de alta congelabilidade, em solução isosmótica, após serem submetidos ao estresse osmótico nas soluções hiperosmóticas dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL). (n=4 garanhões/ 8 ejaculados).

Parâmetros	Controle	DA	MF	DF	GL
MT	84,5±7,4^{a}	70,2±12,4^{b}	73,8±12,2^{b}	70,5±9,3^{b}	49±20,4^{c}
MP	35,9±11^{a}	21±11,5^{bc}	26,9±12,8^{b}	24±10,7^{bc}	17,3±9,3^{c}
LIN	42,8±4,6	35±4,3	38,6±2,1	36,7±3,2	40,1±15,6
RAP	78,7±9,8^{a}	53,5±18,2^{b}	54,8±19,6^{b}	56,5±11,3^{b}	24,8±18,3^{c}
IMP	66±13,5^{a}	40,91±8^{b}	43,6±6,3^{b}	42,4±9,9^{b}	28±10,1^{c}
IAC	87,1±5,1^{a}	75±6,4^{b}	77,2±5,8^{b}	74,6±9,9^{b}	54,9±12^{c}
PMM +	66,4±9,4^{a}	59,3±9^{b}	60,3±8,2^{b}	62,7±9,3^{b}	46,7±10,6^{c}

^{abc}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p<0,001$)

Tabela 10 - Média em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +) dos espermatozóides de garanhões de baixa congelabilidade expostos ao estresse osmótico em soluções a 1 Molar dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL). (n=6 garanhões/ 12 ejaculados)

Parâmetros	Controle	DA	MF	DF	GL
MT	72,7 ± 8,4^{a}	11,2 ± 10,8^{d}	49± 26,1^{b}	34,7 ± 24,5^{bc}	22 ± 17,8^{cd}
MP	39,5±19,9^{a}	3,5 ± 3^{b}	13,7±12^{b}	3,25 ± 2,63^{b}	3,5± 3,5^{b}
LIN	45± 10,1	47,5± 32,2	40,2 ± 4,2	42,25±12,58	44,7 ± 6,9
RAP	62,5±12,1^{a}	8,2± 4,5^{c}	40±27,2^{b}	12,7 ±9,29^{ab}	7,5± 8,8^{c}
IMP	50,2 ±3,5^{a}	43,5±10^{ab}	39,7 ±6,8^{b}	42,25 ± 6,08^{b}	31,2 ±9,5^{b}
IAC	83,7 ± 7,1	72,2± 9,6	85,5 ± 9,8	77,25 ±13,15	74±11,5
PMM +	46,2± 5^{a}	20,5± 8,5^{b}	23,7 ±7,3^{b}	23,00 ± 4,32^{b}	23,7± 9,1^{b}

^{abcd}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p<0,001$)

Tabela 11 - Média em percentagem e Desvio padrão dos parâmetros de Motilidade Total (MT), Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Rápidos (RAP), Integridade de Membrana (IMP), Integridade Acrossomal (IAC) e Potencial de Membrana Mitocôndrial (PMM +), dos espermatozóides de garanhões de baixa congelabilidade, em solução isosmótica, após serem submetidos ao estresse osmótico nas soluções hiperosmóticas dos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol. (n=12 ejaculados/6 garanhões).

Parâmetros	Controle	DA	MF	DF	GL
MT	72,7±8,4[a]	55,5±18[a]	70±9,9[a]	56,2±18,6[a]	27,7±3,3[b]
MP	39,5±19,9[a]	16±12,3[b]	32,7±12[a]	19,5±13,1[b]	14,7±18,7[b]
LIN	45±10,1	36±3,7	40,75±3,7	39±3,16	40,7±8,73
RAP	62,±12,1[a]	43,2±27,2[a]	57,2±13,7[a]	43,5±26,8[a]	23,2±26,8[b]
IMP	50,2±3,5[a]	28,7±7,6[b]	31,75±7,8[b]	26,2±6,7[b]	5,5±3,3[c]
IAC	83,7±7,1[a]	52,7±5,6[b]	53,75±7[b]	51±3,6[b]	34,7±4,5[c]
PMM +	46,2±5[a]	48,7±6,2[a]	48,7±6,24[a]	49±7,2[a]	35,2±4,7[b]

[abc]Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p<0,0001)

Tabela 12 – Média em percentagem e desvio padrão dos parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), integridade de membrana (IMP) e integridade acrossomal (IAC) dos espermatozóides de garanhões de alta congelabilidade expostos ao estresse osmótico com os diferentes tratamentos, nas situações de exposição à solução hiperosmótica a 1 Molar (1M) e isosmótica (ISO) (n=8ejaculados/4 garanhões).

		DA		MF		DF		GL	
Parâmetros	**Controle**	**1M**	**ISO**	**1M**	**ISO**	**1M**	**ISO**	**1M**	**ISO**
MT	84,5±7,4^{a}	13,5±16,9^{e}	70,2±12,4^{bc}	66±8,6^{c}	73,82±12,2^{b}	48,2±22^{d}	70,54±9,3^{bc}	48,9±22,7^{d}	49±20,4^{d}
MP	35,9±11,^{a}	3,4±4,5^{d}	21± 1,5^{b}	13± 10^{c}	26,9±12,8^{b}	10±13,7^{c}	24± 10,7^{b}	12,4±8,3^{c}	17,3±9,3^{bc}
IMP	66± 13,5^{a}	50,2±9^{bc}	40,9± 8^{c}	52,6±6,1^{b}	43,6±6,3^{c}	57±11,3^{b}	42± 9,9^{c}	46,3±10,6^{bc}	28±10,1^{d}
IAC	87,1±5,1^{a}	88,2±3,2^{a}	75 ± 6,4^{b}	90,6±2,1^{a}	77,2±5,81^{b}	88,8±3^{a}	74,6±9,9^{b}	89,2±5,4^{a}	54,9±12^{c}

^{abcd}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p<0,001$)

Tabela 13 – Percentual de perda nos parâmetros de motilidade total e progressiva computadorizada, integridade de membrana e acrossomal, após os espermatozóides de garanhões de alta congelabilidade, serem submetido ao estresse osmótico, nos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL), em relação ao controle.

Parâmetros	Controle	DA	MF	DF	GL
MT	0 (84,54)	16,8 (70,2)[a]	12,6 (73,8)[a]	16,5 (70,5)[a]	57,9 (49)[b]
MP	0 (35,9)	41,5 (21)[a]	25,6 (26,9)[a]	32,9 (24)[a]	51,6 (17,3)[b]
IMP	0 (66)	38,0 (40,9)[a]	33,9 (43,6)[a]	35,7 (42,4)[a]	57,6 (28)[b]
IAC	0 (87,1)	13,9 (75)[a]	11,3 (77,2)[a]	14,3 (74,6)[a]	37,0 (54,9)[b]

[ab]Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p<0,001$)

Tabela 14 – Média em percentagem e desvio padrão dos parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), integridade de membrana (IMP) e integridade acrossomal (IAC) dos espermatozóides de garanhões de baixa congelabilidade expostos ao estresse osmótico com os diferentes tratamentos, nas situações de exposição à solução hiperosmótica a 1 Molar (1M) e isosmótica (ISO) (n=12 ejaculados/6 garanhões).

		DA		***MF***		***DF***		***GL***	
Parâmetros	***Controle***	***1M***	***ISO***	***1M***	***ISO***	***1M***	***ISO***	***1M***	***ISO***
MT	72,7±8,4^{a}	11,2±10,8^{c}	55,5±18^{a}	49±26,1^{ab}	70±9,9^{a}	34,7±24,5^{bc}	56,2±18,6^{a}	22±17,8^{c}	27,7±31,3^{c}
MP	39,5±19,9^{a}	3,5± 3^{b}	16±12,3^{b}	13,7±12^{b}	32,7±12^{a}	3,2±2,6^{b}	19,5±13,18^{b}	3,5±3,5^{b}	14,7±18,7^{b}
IMP	50,2±3,5^{a}	43,5±10^{b}	28,7±7,6^{c}	39,7±6,8^{b}	31,7±7,80^{c}	42,2±6^{b}	26,2±6,7^{c}	31,2±9,5^{c}	5,5±3,3^{d}
IAC	83,7±7,1^{a}	72,2±9,6^{a}	52,75±5,6^{b}	85,5±9,8^{a}	53,7±7^{b}	77,2±13,1^{a}	51±3,6^{b}	74±11,5^{a}	34,7±4,5^{c}

^{abc}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (p<0,001)

Tabela 15 – Percentual de perda nos parâmetros de motilidade total e progressiva computadorizada, integridade de membrana e acrossomal, após os espermatozóides de garanhões de baixa congelabilidade, serem submetido ao estresse osmótico, nos crioprotetores, dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL), em relação ao controle.

Parâmetros	Controle	DA	MF	DF	GL
MT	0 (72,7)	23,7 (55,5)^{b}	2,7 (70)^{a}	21,8 (56,2)^{b}	61,5 (27,7)^{c}
MP	0 (39,5)	59,5 (16,0)^{b}	17 (32,7)^{a}	50,6 (19,5)^{b}	62,6 (14,7)^{b}
IMP	0 (50,2)	42,7 (28,7)^{a}	36,8 (31,7)^{a}	47,7(26,2)^{a}	89 (5,5)^{b}
IAC	0 (83,7)	37 (52,7)	35,8 (53,7)	39,1 (51)	58,5 (34,7)

^{abc}Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($p<0,001$)

III – EXPERIMENTO III

A fertilidade do sêmen do garanhão de alta congelabilidade (G11), utilizada no presente experimento, não foi prejudicada com a exposição dos espermatozóides ao estresse osmótico induzido com os diferentes crioprotetores. Obteve-se um total de 72 % de prenhes (90), nos 125 ciclos, e os resultados de prenhes do grupo controle não diferiram dos tratamentos ($p>0,005$). (Tabela 16)

Porém quando se utilizou o garanhão de baixa congelabilidade (G33), observou-se uma queda significativa da fertilidade nos tratamentos dos diferentes crioprotetores entre o grupo controle , as amidas não demonstraram diferenças entre si, e foram superiores ao tratamento glicerol ($p<0,001$). Tabela 16 e Gráfico 7.

Quando foram avaliados todos os ciclos, sem considerar a variável garanhão, novamente o grupo controle foi superior a todos os tratamentos, entretanto os tratamentos amidas foram sempre superiores ao glicerol e não apresentando diferenças entre si. ($p<0,01$). Tabela 16 e Gráfico 7.

Na avaliação da fertilidade dos garanhões em relação aos tratamentos, não se observou diferenças no grupo controle entre os dois garanhões ($p>0,05$). No tratamento DA, o garanhão de alta congelabilidade foi superior ao garanhão de baixa ($p=0,04$). O crioprotetor MF apresentou resultados superiores nos índices de fertilidade do garanhão de alta em comparação ao garanhão de baixa congelabilidade ($p=0,01$), no tratamento DF o resultado também foi significativamente superior ao garanhão de alta ($p=0,02$). No tratamento glicerol foi evidenciado uma diferença altamente significativa na fertilidade do sêmen entre o garanhão de alta em relação a garanhão de baixa congelabilidade, demonstrando que o glicerol foi extramente tóxico, interferindo na fertilidade dos espermatozóides do garanhão de baixa congelabilidade ($p<0,0001$). Tabela 16.

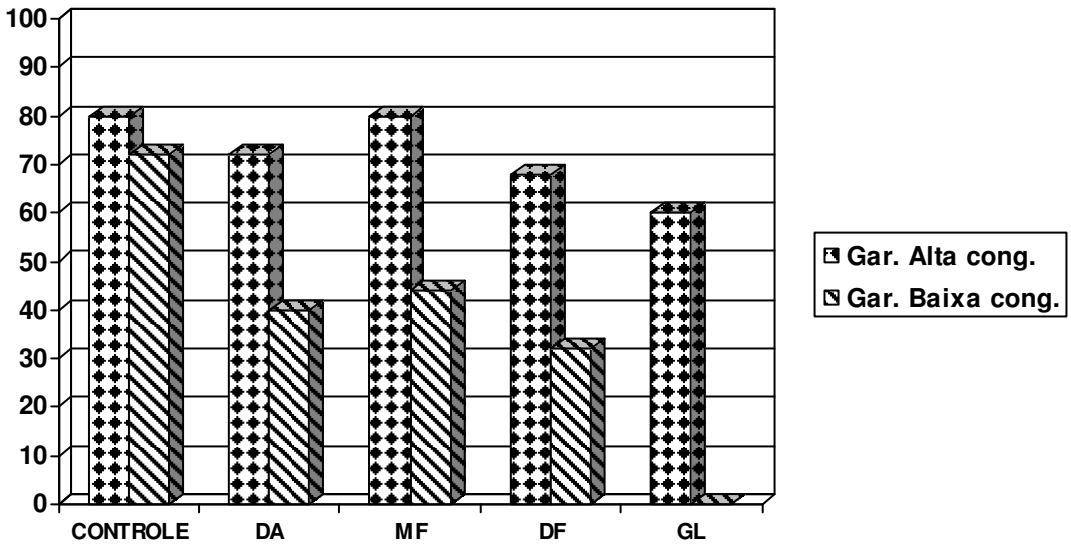
Tabela 16 – Percentual de fertilidade do sêmen de garanhões de Alta (G11) e Baixa (G33) congelabilidade, quando submetidos ao estresse osmótico nos diferentes crioprotetores: dimetiacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL).

.

	Controle	DA	MF	DF	GL	
Garanhão Alta Congelabilidade (n= 125)	80 (20/25)	72^{A} (18/25)	80^{A} (20/25)	68^{A} (17/25)	60^{A} (15/25)	
Garanhão Baixa Congelabilidade (n= 125)	72^{a} (18/25)	40^{Bb} (10/25)	44^{Bab} (11/25)	32^{Bb} (8/25)	0^{Bc} (0/25)	P<0,001
		P=0,04	P=0,01	P=0,02	P<0,0001	
Total de Ciclos (n=250)	76^{a} (38/50)	56^{ab} (28/50)	62^{ab} (31/50)	52^{abc} (26/50)	30^{c} (15/50)	P<0,01

[abc]Resultados seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem estatisticamente
[ABC]Resultados seguidos de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente

Gráfico 7 – Comparação entre a fertilidade do sêmen de garanhões de Alta (G11) e Baixa (G33) congelabilidade, quando submetidos ao estresse osmótico nos diferentes crioprotetores: dimetiacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL).



6. DISCUSSÃO

Os resultados do experimento I demonstraram que dos 27 garanhões avaliados, 9 (33%) apresentaram congelabilidade aceitável e eram pertencentes às raças Westfallen e Brasileiro de Hipismo, seis (22%) se enquadraram em um grupo intermediário, sendo este composto de um garanhão da raça Quarto de Milha, dois garanhões da raça Árabe, dois Mangalarga Marchador e um Westfallen. Em relação aos resultados pós – descongelação do grupo de garanhões com congelabilidade não aceitáveis, enquadraram-se 12 animais da raça da raça Mangalarga Marchador (45%). Em 1975, Tishner, constatou que somente 25% dos garanhões eram classificados como boa congelabilidade, 50% produziam sêmen de congelabilidade intermediaria e 25% apresentavam sêmen com qualidade insatisfatória. Posteriormente Muller (1987), observou que 35% dos garanhões apresentavam características seminais, como a motilidade total, acima de 30%. Entre os garanhões classificados como bons congeladores os resultados descritos por estes autores, se assemelham aos encontrados no presente estudo e também aos encontrados por Vidament *et.al.,* (1997), onde na avaliação de 427 garanhões encontraram um percentual de 30% dos garanhões com congelabilidade aceitável. Vale ressaltar que os garanhões utilizados neste trabalho eram pertencentes somente à raça Sela francesa e a seleção quanto à congelabilidade foi relacionada ao aproveitamento dos ejaculados congelados e não a características raciais.

O fator racial envolvido no sucesso da congelação de sêmen eqüino foi demonstrado por Alvarenga *et. al.,* (1996), os quais constataram que 50% dos garanhões das raças de Hipismo de origem germânicas e Quarto de Milha apresentaram sêmen com um padrão aceitável pós – descongelação.

O fato da maioria dos garanhões utilizados no presente experimento apresentarem um padrão de congelação não aceitável é decorrente da presença de um grande número de animais da raça Mangalarga Marchador entre o total dos garanhões avaliados no experimento. Dos 27 garanhões, 11 (45%) eram pertencentes à raça Mangalarga Marchador, fator este também

observado no trabalho de Alvarenga et. al., (1996) onde concluíram que somente 15% dos garanhões das raças Mangalarga Marchador e Mangalarga apresentavam resultados aceitáveis de congelabilidade. Dentre a literatura citada, os fatores relacionados à variação individual e racial da resposta pós-descongelação, permanecem ainda não evidenciados. Estudos como de Zahn (2004) onde foram avaliadas características relacionadas à congelabilidade do sêmen de garanhões, relacionaram o teor de fósforo no plasma seminal, o qual foi atribuído negativamente à congelabilidade individual, juntamente com algumas proteínas do plasma seminal e da membrana plasmática dos espermatozóides.

Diferenças raciais em relação à congelabilidade de sêmen suíno foram estudadas entre cachaços das raças Landrace e Duroc, entretanto, o fator individual relacionado foi mais importante do que a variação racial dos cachaços e também foi constatado que a composição dos lipídios da membrana plasmática não apresenta relação com a congelabilidade (Waterhouse *et. al*., 2006). Em trabalho anterior Thurston *et.al*. (2002) observaram que a congelabilidade de sêmen de suínos pode estar atribuída a genes responsáveis por esta característica. Tada *et. al*., (1990) comparou curvas de congelação e constituintes do meio diluente, incluindo o glicerol e constataram que determinadas linhagens de camundongos apresentavam particularidades ao protocolo de congelação utilizado e principalmente uma sensibilidade ao nível de glicerol utilizado no meio diluente.

A variação da congelabilidade entre espécies e indivíduos relacionada aos crioprotetores e a sensibilidade ao glicerol é bem descrita na literatura em espécies como aves (Tselutin *et. al*., 1999), suínos (Fiser e Fair Full, 1990), cães (Hay *et al.,* 1997), Homens (Panayota *et al***.,** 1998) e eqüinos (Pace e Sullivan, 1975; Demick *et al*.,1976) e coincidem com os resultados do presente experimento, o qual se observou que os crioprotetores a base de amidas (DA, MF e DF), foram mais eficientes em relação ao glicerol em preservar os parâmetros de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana nos 27 garanhões avaliados.

Resultados similares foram obtidos por Medeiros *et. al.,* (2002), que utilizando 10 garanhões de diferentes raças observaram que os crioprotetores a base de amidas, preservaram melhor a motilidade total, progressiva e

integridade de membrana do sêmen pós – descongelação. No entanto em trabalhos de Graham (2000), Alvarenga *et al.,* (2000) e Squires *et. al*.,(2004), não houve diferença em relação a dimetilformamida e o glicerol na motilidade total computadorizada e viabilidade celular avaliada por citometria de fluxo. Sendo este fato atribuído pelos autores a variações raciais e individuais referentes a congelabilidade frente ao glicerol, ou seja, existem indivíduos que resistem melhor ao processo de congelação e descongelação independentemente do crioprotetor utilizado. Esta hipótese foi reforçada por Vidament *et. al.,* (2002) em trabalho onde foi avaliada a fertilidade do sêmen de garanhões com boa aptidão a congelação, criopreservados com glicerol e dimetilformamida e não foram constatadas diferenças na fertilidade entre os dois crioprotetores.

Nas avaliações do grupo de garanhões de alta congelabilidade coincidem com a literatura citada acima, onde não foi constatado diferenças entre crioprotetores nos parâmetros de motilidade total computadorizada. Porém para os parâmetros de motilidade progressiva e integridade de membrana os tratamentos amidas foram superiores ao glicerol.

Nas avaliações do grupo de garanhões de baixa congelabilidade, os quais coincidentemente eram animais da raça Mangalarga Marchador, os tratamentos amidas apresentaram resultados altamente superiores e significativos em comparação ao glicerol. Resultados semelhantes foram obtidos por Gomes *et.al.* (2002), em trabalho onde foram utilizados somente garanhões da raça Mangalarga Marchador e obtiveram resultados superiores nos parâmetros de motilidade computadorizada e integridade de membrana com a utilização de crioprotetores a base de amidas.

Dentro deste contexto, os resultados do presente experimento coincidem também com os de Alvarenga (2003), que constatou que a dimetilformamida foi mais eficiente como agente crioprotetor, frente ao glicerol, na maioria dos garanhões avaliados, e também observou este autor que garanhões da raça Mangalarga Marchador foram os indivíduos que pior resistiram ao processo de congelação quando do uso do glicerol como agente crioprotetor, onde dos 17 garanhões pertencentes a esta raça, somente 2 (11,7%) apresentaram boa congelabilidade com o uso do glicerol em comparação a 11 (64,7%) quando do uso da dimetilformamida.

Um dos fatores envolvidos na sensibilidade destes indivíduos classificados como de baixa congelabilidade no presente experimento e citados na literatura pode estar relacionado as característico físico - químicas do glicerol, no que se refere à viscosidade e peso molecular. Trabalhos demonstraram que os álcoois como é classificado o glicerol, possuem grupos hidroxilas que tem a capacidade de formar ligações com a molécula da água e ligar-se com outros componentes do meio diluente que também contenham estes grupos hidroxilas, conferindo a estas substâncias alta viscosidade (Nash, 1966; Karow, 2001) e dificultando assim sua difusão nas membranas plasmáticas podendo acarretar em danos osmóticos aos espermatozóides, fato este demonstrado por Ball e Vo (2001) em sêmen de garanhões. Wowk et al. (1999), notaram que a substituição dos grupos hidroxilas por grupos carboxil ($-0CH_3$), em poliois como o glicerol, conferiram a estes uma menor viscosidade e uma melhor atividade coligativa, porém a substância derivada apresentou uma alta toxicidade celular. A característica de alta viscosidade talvez seja mais importante que o peso molecular, pois a dimetilacetamida apresenta peso molecular próximo ao do glicerol (87 e 90 respectivamente), no entanto os resultados do presente experimento demonstraram resultados superiores deste crioprotetor em relação ao glicerol nas diferentes categorias de garanhões estudadas.

Os garanhões de Alta congelabilidade (4 indivíduos da raça Westfallen) e os garanhões de Baixa congelabilidade (6 indivíduos da raça Mangalarga Marchador) identificados no presente experimento foram utilizados no experimento II.

No experimento II, com a exposição dos espermatozóides em soluções hiperosmóticas a 1 Molar, foram evidentes a diminuição dos valores de motilidade total e progressiva, percentual de rápidos, integridade de membrana e potencial de membrana mitocôndrial dos diferentes tratamentos em relação ao controle em todos os garanhões avaliados. Nesta etapa os espermatozóides foram expostos a osmolaridade superiores a 1000 mOsm. Pommer et. al., (2002), também evidenciou este fato, em espermatozóides de garanhões, onde a exposição destes em soluções de sais hipersaturadas, resultou em decréscimo na motilidade, viabilidade celular e diminuição do volume celular, conseqüente da desidratação das células espermáticas,

resultados semelhantes também foram obtidos por Ball e Vo (2001) e concluíram que os espermatozóides de garanhões resistem a variações de até 100mOsm em relação a sua osmolaridade fisiológica sem efeitos prejudiciais a motilidade e a viabilidade celular.

No grupo de garanhões de alta congelabilidade em condição de hiperosmolaridade, foram evidenciadas as mesmas variações dos resultados anteriores , porém as diferenças entre os tratamentos amidas e o glicerol foram, de uma forma geral menos marcantes. Parâmetros como a motilidade progressiva e percentual de espermatozóides rápidos não apresentaram diferenças entre a metilformamida e o controle, e foram superiores a dimetilformamida e a dimetilacetamida. Em relação aos garanhões de baixa congelabilidade, os parâmetros avaliados demonstraram as mesmas características anteriores, entretanto o tratamento glicerol trouxe prejuízos mais significativos, nas variáveis de motilidade total e progressiva, os crioprotetores dimetilformamida e dimetilacetamida também acarretaram uma diminuição acentuada dos parâmetros avaliados nesta etapa do experimento, porém menos deletérios que o glicerol.

Trabalhos desenvolvidos por Gilmore et. al., (1995) em espermatozóides humanos, Gilmore et. al*.,* (1996) em espermatozóides suínos e Willoughby et.al*.,* (1996) com sêmen de camundongos, coincidem com os resultados obtidos no presente experimento, estes autores evidenciaram uma diminuição dos parâmetros de motilidade e integridade de membrana quando estes espermatozóides foram mantidos em condições de hipertonicidade. Em trabalho realizado por Ball e Vo (2001), empregando diferentes níveis de glicerol em soluções de osmolaridade variando de 600 a 1800 mOsm, a exposição dos espermatozóides nestas soluções acarretaram diminuições nos valores de motilidade e integridade de membrana, concordando com os resultados encontrados no presente trabalho. Em outro experimento avaliando os crioprotetores glicerol, propilenoglicol, etilenoglicol e DMSO, estes autores observaram que quando os espermatozóides são expostos à solução hiperosmótica destes crioprotetores, ocorre um declínio na motilidade total, progressiva e integridade de membrana. Dentre os tratamentos o glicerol foi o crioprotetor que apresentou um maior decréscimo na viabilidade espermática,

entretanto neste trabalho não foi constatado prejuízos na integridade acrossomal, constatando o achado do presente estudo.

Não existem dados na literatura estudando a permeabilidade das amidas na membrana plasmática de espermatozóides, supostamente os resultados favoráveis com as amidas, no presente estudo, possa estar relacionado à maior permeabilidade destes crioprotetores na célula espermática quando comparada ao glicerol.

Gilmore *et. al.,* (1998) também constataram que a adição e remoção do glicerol causou uma maior variação no volume celular e diminuição da motilidade espermática, quando comparado ao etilenoglicol, observando uma melhor eficácia do etilenoglicol como crioprotetor, e concluíram que este fato foi decorrente de sua maior permeabilidade na membrana dos espermatozóides de suínos. Em camundongos também foi evidenciado diferenças na permeabilidade do glicerol entre linhagens de camundongos (Yuksel *et. al.* 2002).

Guthrie et.al., (2002) observaram que os crioprotetores etilenoglicol e DMSO possuem um maior coeficiente de permeabilidade celular em relação ao glicerol, por isso acarretam menores injurias aos espermatozóides de touros.
Também foram observadas no presente estudo diferenças entre os garanhões, nos tratamentos amidas dentre os parâmetros avaliados, apesar dos dados individuais dos garanhões não serem apresentados. A variação entre espécies animais em relação à crioprotetores é bem discutida na literatura. Dentro deste contexto, pesquisadores americanos demonstraram que os espermatozóides de cães não foram afetados pela exposição em soluções hipertônicas de açucares, glicerol e etilenoglicol, no entanto o DMSO foi extremamente tóxico a estas células (Songsasen *et. al*., 2002). Espermatozóides de chimpanzés também apresentam uma considerável resistência osmótica, traduzida pela manutenção da motilidade, quando expostos em soluções a 1 Molar dos crioprotetores etilenoglicol, propilenoglicol, glicerol e DMSO (Yuksel *et al*., 2005).

Em estudos envolvendo diferentes espécies de aves foi demonstrado, que existe uma grande variação entre espécies, quanto à adaptação das células espermáticas a mudanças de osmolaridade. Observou-se que, os espermatozóides das Águias Douradas e dos Falcões Peregrinos,

apresentaram uma maior resistência a exposição em diferentes concentrações do crioprotetor dimetilacetamida (Blanco *et. al.*,2000).

Na etapa seguinte do presente estudo, quando os espermatozóides retornaram a condição de isosmolaridade, na totalidade dos garanhões e no grupo dos garanhões de alta congelabilidade isoladamente, observaram-se diminuições significativas em quase todos os parâmetros avaliados, sendo ainda mais evidentes com o uso do crioprotetor glicerol. Em relação aos garanhões de baixa congelabilidade os prejuízos em relacionados ao choque osmótico com o glicerol foram mais intensos quando comparados aos tratamentos amidas. As células espermáticas são mais sensíveis ao ingurgitamento do que a desidratação (Meyers, 2005), condições estas a que as células espermáticas foram submetidas no presente experimento. O prejuízo a integridade e funcionalidade espermática proporcionado pelo glicerol em soluções hiperosmoticas e o retorno a condições de isosmolaridade também foi demonstrado por Ball e Vo (2001), onde se constatou uma queda nos parâmetros avaliados asociada a baixa permeabilidade do glicerol na membrana dos espermatozóides de garanhões. Durante a incubação em soluções hiperosmótica ocorre à saída de água da célula espermática e o preenchimento do compartimento intracelular pelo glicerol, com o retorno a condições de isosmolaridade a água tende a entrar novamente na célula para que ocorra o equilíbrio entre os meios intra e extracelular, mas como o glicerol possui uma baixa permeabilidade celular sua saída do interior da célula fica comprometida, acarretando uma entrada excessiva de água no meio intracelular comprometendo sua viabilidade. Em outro estudo estes autores também demonstraram que o crioprotetor etilenoglicol foi o que menos acarretou danos celulares após o estresse osmótico induzido nos espermatozóides. Guthrie et. al.,(2002) observaram que a adição de 1 Molar dos crioprotetores Glicerol, DMSO e etilenoglicol e posteriormente a remoção destes crioprotetores por centrifugação resultou em uma queda na motilidade na ordem de 31% para o glicerol, 90% para o DMSO e 6% para o etilenoglicol. Perdas nos parâmetros de motilidade total, progressiva, integridade de membrana e acrossomal, foram constatadas nos grupos de garanhões de alta e baixa congelabilidade, após estes serem submetidos ao estresse osmótico, porém o percentual de perda entre os dois grupos de garanhões foram mais

expressivos do que os relatados em bovinos, demonstrando que os espermatozóides de garanhões são mais sensíveis ao estresse osmótico e principalmente quando induzido pelo glicerol. Na comparação entre espermatozóides de chimpanzés e humanos submetidos a condições de hiperosmolaridade, ambos apresentaram redução na motilidade espermática nesta condição, porém com o retorno as condições de isosmolaridade os espermatozóides humanos, apresentaram um restabelecimento de 90% (Gao et. al., 1995) em comparação a 35% da motilidade dos espermatozóides de chimpanzés (Agca et.al., 2005).

Também foi constatado que no grupo de garanhões de alta congelabilidade o potencial de membrana mitocôndrial não apresentou diferenças entre os tratamentos amidas e o controle, porém em relação à motilidade houve diferença entre o grupo controle e os tratamentos, não demonstrando uma relação entre esta avaliação e a motilidade espermática. Entretanto no grupo de garanhões de baixa congelabilidade o potencial de membrana mitocôndrial comportou-se como os resultados de motilidade, com diminuição dos valores, após as células espermáticas serem submetidas ao estresse osmótico.

O potencial de membrana mitocôndrial também não teve relação e não evidenciou a queda de motilidade dos espermatozóides de *Macaco Rhesus*, submetidos ao estresse osmótico (Ruttland et. al., 2003), estas observações também foram feitas por Thomas *et. al.,* (1998), os quais encontraram uma correlação negativa entre o potencial de membrana mitocôndrial e motilidade do sêmen a fresco e após a congelação das amostras não encontraram correlação. Outros pesquisadores como Garner *et.al*., (1999), observaram uma diminuição do potencial de membrana mitocôndrial das células coradas com JC1, após a adição do glicerol nas amostras de sêmen de touros.

O presente experimento demonstrou existir diferenças entre indivíduos quanto à resistência das células espermáticas ao choque osmótico e também a crioprotetores, diferenças estas podem ser atribuídas a constituição da membrana e a eficiência desta membrana em efetuar uma regulação osmótica frente à osmolaridade fora dos padrões fisiológicos destas células,

podendo estas características, estarem envolvidas com a congelabilidade destes indivíduos.

Os resultados obtidos no Experimento III, com o garanhão de alta congelabilidade, não apresentaram diferenças entre os crioprotetores e o grupo controle nos índices de fertilidade, em comparação com aos resultados laboratoriais do Experimento II, os quais demonstraram uma melhor eficiência dos crioprotetores a base de amidas em preservar a viabilidade espermática em comparação ao glicerol. Este crioprotetor na afetou a fertilidade dos espermatozóides deste garanhão após serem submetidos ao estresse osmótico.

Este fato reforça a hipótese da existência de indivíduos que possuem uma maior resistência celular ao glicerol, ou seja uma maior eficiência da célula espermática em regular seu volume, em osmolaridades foras dos padrões fisiológicos, este aspecto tem sido bem demonstrado em espermatozóides de diferentes espécies animais e em humanos. Trabalhos desenvolvidos por pesquisadores como, Yeung *et al.*, (2000), demonstraram a importância da regulação osmótica das células espermáticas de camundongos, onde linhagens transgênicas destes animais, com características débeis em relação à regulação osmótica celular, comprometeram de forma significativa a fertilidade destes animais por método natural, a despeito da fertilidade com técnicas de fertilização *in vitro* ser normal. A inibição da regulação volumétrica celular pela incubação do sêmen humano em substâncias bloqueadoras dos canais de íons levou a diminuição significativa da migração dos espermatozóides no muco cervical (Yeung e Coopers, 2001). A inibição dos canais Na+/K+ e Na/K ATPase, pela incubação dos espermatozóides eqüinos em substâncias como o amiloride e a oubain, Caiza de la Cueva et. al., (1997), observaram uma diminuição da viabilidade do sêmen frente a soluções hipertônica de glicerol e sais e concluíram que a regulação osmótica dos espermatozóides de garanhões é de grande importância na criopreservação.

Os resultados do presente estudo, também evidenciam que a característica de eficiência da regulação osmótica pode estar relacionada com a composição celular, ou seja, devem existir alguns componentes da membrana espermática dos indivíduos tidos como de alta congelabilidade, que os conferem uma melhor adaptação celular a meios extracelulares de

diferentes osmolaridades. Petrunkina et. al., (2004) associou o estresse osmótico em espermatozóides de suínos a deficiência na regulação osmótica destas células em condições de osmolaridade não fisiológica observando danos no cito - esqueleto destes espermatozóides o que comprometeu de forma significativa o mecanismo de capacitação destas células. Esta hipótese pode explicar os baixos índices de fertilidade, no presente experimento, apresentado pelo garanhão de baixa congelabilidade, em comparação ao garanhão de alta congelabilidade, e a não constatação de prenhes no tratamento glicerol no garanhão de baixa congelabilidade.

A hipótese dos crioprotetores a base de amidas possuírem uma maior permeabilidade celular, e esta característica acarretar menores danos celulares parece bastante plausível pelos resultados obtidos com o crioprotetor dimetilacetamida, citado no experimento II, onde demonstrou que ocorrendo uma queda significativa na motilidade durante a incubação em solução a 1 Molar com esse crioprotetor, ocorreu uma preservação da integridade de membrana e com o retorno a condições de isosmolaridade, houve um restabelecimento da motilidade e esta mudança de osmolaridade não prejudicou a capacidade fertilizante dos espermatozóides com o garanhão de alta congelabilidade. Da mesma forma mostrando-se superiores ao glicerol no garanhão de baixa congelabilidade.

O efeito contraceptivo do glicerol, nos resultados de fertilidade, observado com o garanhão de baixa congelabilidade, foram citados anteriormente, onde a simples diluição do sêmen com este crioprotetor acarretou uma diminuição significativa das taxas de prenhes em éguas (Pace & Sullivan, 1975), sendo este fato também constatado por Demicke *et. al*., (1976), com sêmen refrigerado diluído em glicerol a 7% (v/v) por um período de duas horas.

Recentemente pesquisadores franceses observaram que a fertilidade do sêmen refrigerado de garanhões, diminuiu conforme o aumento nos níveis de glicerol no diluente e também se demonstrou que alguns garanhões não apresentaram prejuízos de fertilidade do sêmen nos níveis de glicerol testados neste estudo (Vidament *et. al*., 2005a). Em estudo retrospectivo da evolução da congelação de sêmen na França, estes pesquisadores também atribuíram a melhoria dos resultados de viabilidade espermática e fertilidade do sêmen pós–

descongelação, a diminuição dos níveis de glicerol no meio diluente (Vidament et. al., 2005b).

Os resultados do presente experimento discordam dos achados de Vidament et 1997, pois no presente experimentos foram selecionados somente indivíduos os quais tinham um histórico de fertilidade normal, acima de 60% de por ciclo. Contudo foi observada uma grande variação na congelabilidade demontrando não haver relação entre congelabilidade e fertilidade do sêmen fresco. Observação marcante para garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais em sua grande maioria apresentavam baixa congelabilidade quando o uso do glicerol a despeito de um bom histórico de fertilidade.

Fica claro perante os resultados obtidos que existe um aspecto racial relacionado à resistência a congelação, conforme já descrito anteriormente em Cavalos (Alvarenga *et. al*., 1996; Alvarenga, 2003) e outras espécies para linhagens de suínos (Thurston *et.al*., 2002) e camundongos (Tada *et. al*., 1990). Contudo também ficou patente que o uso de derivados de amidas a despeito de não eliminar por completo, minimiza os danos osmóticos nas células espermáticas.

7 – CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho nos permitem concluir que:

.

- As diversas formas de amidas utilizadas neste trabalho foram mais eficientes que o glicerol na preservação da motilidade total e integridade de membrana pós – descongelação.
- Existe uma variação racial e individual quanto ao sucesso na congelação do sêmen equino com a utilização do glicerol como crioprotetor.
- Garanhões das raças de hipismo apresentaram bom padrão de congelabilidade com a utilização do glicerol como crioprotetor.
- Garanhões de alta congelabilidade apresentam uma maior resistência ao estresse osmótico independente do tipo de crioprotetor.
- Garanhões de baixa congelabilidade são mais sensíveis ao dano osmótico independente do tipo de crioprotetor, contudo o dano é sempre maior quando do uso do Glicerol.
- Não houve efeito deletério sobre a fertilidade do sêmen a fresco do Garanhão de Alta Congelabilidade quando submetido ao stress osmótico nos diferentes crioprotetores.
- Houve efeito deletério sobre a fertilidade do sêmen a fresco do Garanhão de Baixa Congelabilidade quando submetido ao stress osmótico nos diferentes crioprotetores. Sendo mais evidente a queda de fertilidade quando do uso do glicerol.
- Os crioprotetores a base de amidas foram mais eficientes ao glicerol em preservar a fertilidade do sêmen a fresco, submetidos ao estresse osmótico, independente do padrão de congelabilidade do garanhão.

8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A variação racial, quanto à congelabilidade do sêmen de garanhões, em especial a raça Mangalarga Marchador é um fato bem abordado na literatura. Os crioprotetores a base de amidas proporcionaram uma diminuição desta variação.

Entretanto os fatores espermáticos que determinam uma maior ou menor resistência ao processo de congelação de sêmen em os garanhões ainda não foram elucidados. No presente estudo foi constatado que os crioprotetores a base de amidas proporcionam menores danos a células espermáticas quando estas são submetidas a condições de estresse osmótico em soluções destes crioprotetores e garanhões classificados como de alta congelabilidade resistem melhor a este desafio em comparação aos garanhões de baixa congelabilidade.

O mecanismo responsável à adaptação das células espermáticas a condições de osmolaridade fora dos padrões fisiológicos, observados nos garanhões de alta congelabilidade pode estar relacionado a diferenças na constituição dos lipídeos e principalmente das proteínas da membrana plasmática dos espermatozóides destes garanhões em comparação aos garanhões de baixa congelabilidade. Algumas proteínas da membrana plasmática dos espermatozóides estão envolvidas na regulação volumétrica das células espermáticas em condições adversas de osmolaridade.

A investigação, em estudos futuros, das diferenças entre a constituição da membrana plasmática dos espermatozóides dos garanhões de alta e baixa congelabilidade, se faz necessária para que esta hipótese seja comprovada.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

AISEN, E. G.; CISALE, H.; FERNANDEZ, H. Criopreservacion de semen ovino. Nueva técnica. **Vet. Argent.**, v.7, p.176-82, 1990.

ALVARENGA, M.A.; GRAHAM, J.K.; KEITH, S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, S.L. Alternative cryprotectors for freezing stallion spermatozoa. 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 2000. **Proceedings…** Stockholm , 2000a, p.157.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging system. **Equine Vet. J**., v.32(6), p.541-5, 2000.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JUNIOR, J. The effect of breed and spermatic parameters over equine semen freezability. In: SYMPOSIUN ON STALLION SEMEN, 1996, Amersfoort. **Proceedings…** Amersfoort, 1996.

ALVARENGA, M.A. **Melhoria da resistência espermática a congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões**. Botucatu, 2002. 79p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ALVARENGA, M.A; PAPA, F.O; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectantsmfor freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science.** v.89, p.105-13, 2005.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of criopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Scie.** v.7, p.145-73, 1987.

AN, T.Z.; IWAKIRI, M.; EDASHIGE, K.; SAKURAI, T.; KASAI, M. Factors affecting the survival of frozen – thawed mouse spermatozoa. **Cryobiology** p.237-49, 2000.

ANZAR, M.; HASSAN, M..M.; GRAHAM, E.F.; DEYO, R.C.M.; SINGH. G. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. **Theriogenology.** v.36, n.2, p.307-17, 1991.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo, 2000. 85p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Mecanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K., FULLER, B. J. eds. **Temperature and animal cells**. Cambridge: The Co. of Biologists Ltd. P. 395-406, 1987.

BALL, B.A; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **J. Andrology** Nov-Dec., v.22(6) p.1061-9, 2001.

BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in the mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. **Can. J. Comp. Med. Vet. Sci**. v.21, p.47-50, 1957.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology.** v.48 p.391-410, 1997.

BLACH, E.L.; AMANN, R.P.; BOWEN, R.A. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. **Theriogenology**, v.31 p.283, 1989.

BLANCO, J.M.; GEE G.; WILDT, D.E; DONOGHUE, A.M. Species variation in osmotic, crioprtectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine falcon spermatozoa. **Bioloy Reproduction**, v.63, p.1164-71, 2000.

BLANES, M.S.; PAPA, F.O.; DORES, C.B.; MELO, C.M.; CROCCI, A.J. Influencia do numero de espermatozóides e tempo de estabilização na congelação de sêmen eqüino utilizando o diluente Botu-crio®. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33 (supl.1), p.303, 2005.

BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; SEIGNEURIN, F. Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. **Reproduction.** v.129, p.371-78, 2005.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reprod. Science.** v.65, p.75-88, 2001.

BORGEL, C. **Studies on cryopreservation of horse spermatozoa in relation to different diluents, sperm concentration and freezing programs**. Hannover, 1994.104p. (Doutorado). Tierarztliche Hochschule Hannover.

BRAUN, J.; HOCHI, S.; OGURI, N.; SAT, K.; TORRES-BOGINNO, F. Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen – thawed stallion spermatozoa. **Cryobiology** v.32 p.487-92, 1995.

BURNS, P.J.; REASNER, D.S. Computadorized analysis of sperm motion: Effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. **J. Equine Vet. Scie.** v.15, n.9, p.377-80, 1995.

CABRITA, E.; ALVAREZ, R.; ANEL, L.; RANA, K.L; HERRAEZ, M.P; Sublethal damage during Cryopreservation of Rainbow Trout Sperm. **Cryobiology** v.37 p.245-53, 1998.

CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; PUJOL M.R.; RIGAU, T.; BONET, S.; MIRÓ, J.; BRIZ, M.; RODRIGUES-GIL, J.E. Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: The role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. Theriogenology. v.48, p.947-68, 1997.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dosespermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2005. 186 p.

CEROLINE, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, M.T. Changes in sperm quality and lipids composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction,** v.121, p.395-401, 2001.

CHENIER, T.; MERKIES, K.; LEIBO, S.; PLANT, C. Evaluation of cryprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. In: PROCEEDINGS FOR ANNUAL MEETING, Baltimore 1998. **Proceedings.** Maryland. 1998, p.52-3.

CHRISTENSEN, P.; PARLEVLIET, J.M.; VAN BUITEN, A.; HYTTEL, P.; COLENBRANDER, B. Ultrastructure of fresh and froze-thawed stallion spermatozoa. **Biol. Reprod. Mono.** v.1 p.769-77, 1995.

CRITSER, J. K. Principle of Cryobiology. In: SEMEN CRYOPRESERVATION & ARTIFICIAL INSEMINATION SYMPOSION, Nashville 1999. **Proceedings…** Tennessee. 1999. p. 241-8.

CRITSER, J. K.; HUSE-BENDA, A.R.; AAKER, D.V.; AMESON, B.W.; BALL, G.D. Criopresevation of human spermatozoa. III. The effect of Crioprotectants on motility. **Fertil. Steril.** v.50 p.314-20, 1988.

CRITSER, J.K.; MOBRAATEN, L.E. Criopreservation of Murine Spermatozoa. **ILAR Journal.** v. 41(4) p.197-206, 2000.

CROCKETT, E.C; GRAHAM J.K; BRUEMMER, J.E; SQUIRES, E.L. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. Theriogenology. v 55(3). p.793 – 803. 2001.

CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVESTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detection acrosome reacted human sperm. **Gamete Research,** v.15, p.213-26, 1986.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**. v. 49. p.831-41. 1997.

DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A.; WHITE, I. G. The effect of cold-shock and freeze-tawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. **Aust, J. Biol. Reprod.** v. 26, p. 1409-20, 1973.

DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.HG.;COLENBRANDER, B.;VERKLEIJ, A.J. Effects of various crioprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v.30 p.32-44, 1993.

DELL`AQUA Jr, J.A; PAPA, F.O.; ALVAREGA, M.A; ZAHN, F.S. The effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen sêmen. In: 3RD INTERNATIONAL SYMPOSIUN ON STALLION REPRODUCTION, 2001, Fort Collins, CO. **Proceedings…**, p.43, Fort Collins,, 2001.

DEMICK, D.S.; VOSS, J.L.; PICKETT, B.W. Effect of cooling, storage with glycerolization and spermatozoa number on equine fertility. **J. Anim. Sci**., v.43, p.633-7, 1976.

DEVIREDDY, R.V.; SWANLUND, D.J.; OLIN, T.; VINCENT, W.; TROEDSSON, M.H.T.; BISCHOF, J.C.; ROBERTS, K.P. Cryopreservation of equine sperm: Optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents

determined using differential scanning calorimetry. **Biology Reproduction.** v.66, p.222-31, 2002.

DEWIT, M.; MARLEY, W.S.; GRAHAM, J.K. Fertilizing potential of mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. **Cryobiology** v.40 p.36-45, 2000.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **J. Exp. Zool.** v.265, p. 432-7, 1993.

FAHY, G. M. The relevance of crioprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology.** v .23, p. 1-13, 1986.

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.247-68, 1990.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L.; Assessment of Psium sativum agglutinin in identifying acrossomal damage in stallion spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.** v.32 p. 27-32, 1992.

FELICIANO SILVA, A.E.D., LIMA DIAS, A., UNANIAN, M.M., FREITAS, A.R., BLOCH JUNIOR, C. Conteúdo de peptídeos e avaliações morfofisiológica dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado de bovinos. **Rev. Bras. Zootec.**, v.32, n.6, supl.2, p.1890-900, 2004

FERNANDES, C. E., FELICIANO SILVA, A. E. Análise de agrupamento para caracterização protéica do sêmen e correlação com o espermograma em touros submetidos a degeneração testicular. **In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 41, 2004. Campo Grande-MS. Anais... Campo Grande: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004, p.1-4

FERREIRA, J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelação do sêmen eqüino.** Botucatu, 2000. 113p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5ml straws. **Mol. Reprod. Dev**., v.25 (2), p.123-9, 1990.

FISHER, L.O; BELLE, G.V. Biostatistics a methodology for the health sciences. **Wiley-Interscience**, New York, 1993. 991p.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their ffect on motility and integrity of bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** v.49 p.277-84, 1977.

GAO, D. Y.; ASHWORTH, E.; WATSON, P. F.; KLEINHANS, F. W.; MAZUR, P.; CRITSER, J. K. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separete effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. **Biol. Reprod**. v. 49, 112-23, 1993.

GAO, D. Y.; LIU, J.; LIU, C.; MC GANN, L. E.; WATSON, P. F.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J. K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reprod.** v. 10, p. 1109-22, 1995.

GAO, D.; CRITSER, J.K. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. **ILAR Journal** v. 41 (4), p.187-96, 2000.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescents staining and flow cytometric analyses. **Biol. Reprod** v.34 p.127-38, 1986.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrossomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in the Domestical Animal.** v.34, p.399-404, 1999.

GILMORE, J.A.; DU, J.; TAO, J.; PETER, A.T.; CRITSER, J.K. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. J. Reproduction Fertility. V.107, p.87-95, 1996.

GILMORE, J.A.; MCGANN, L.E.; LIU, J.; GAO, D.Y.; PETER, A.T.; KLIENHANS, F.W.; CRITSER, J.K. Effect of crioprotectants solutes on water permeability of human spermatozoa, **Biology Reproduction**, v.53, p.985-95, 1995.

GILMORE, J.A; LIU, J.; PETER, A.T.; CRITSER, J.K. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **Biology Reproduction**. v.58, p.28-38, 1998.

GIRAUD, M.N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction.** v.15(10), p. 2160-64, 2000.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.; ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology.** v.58, p.277-9, 2002.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Vet. Clin. North Am. Eqquine Pract.** v.12 p.119-30, 1996.

GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa**.** 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 2000. **Proceedings…** Stockholm, 2000 p.307

GUAY, P.; RONDEAU, M.; BOUCHER, S. Effect of glycerol on motility, viability, extracellular aspartate aminotransferase release and fertility of stallion semen before and after freezing. **Equine Vet. J.**, v.13(3), p.177-82, 1981.

GUTHIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J.K.; Osmotic tolerance limits and effect of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biology Reproducion**, v.67, p.1811-16, 2002.

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

HANADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **J. Rep. Fert**, v.60, p.247-52, 1980.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v.88 p.343-52, 1990.

HAY, M.A.; KING, W.A; GARTLEY, C.J.; LEIBO, S.P.; GOODROWE, K.L. Effects of cooling, freezing and glicerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. **J. Reprod. Fertil. Suppl**., v.51, p.99-108, 1997.

HE, L.; BAILEY, J.L.; BUHR, M.M. Icorporating lipids into boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. **Biology Reproduction,** v.64, p.69-79, 2001.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance if species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

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

HOLT, W.V.; MEDRANO, A.; THURSTON, L.M.; WATSON, P.F The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation; insights from cryomicroscope. **Theriogenology**. v.63, p.370-82, 2005.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. **Biology Reproduction**. v.51, p.414-24, 1994.

ISHIBASHI, K.; KUWAHARA, M.; GU, Y. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glyceol and urea. **Journal of Biol. Chem.** v.272, p.20782-20786, 1997.

JAMES, P.S.; WOLFE, C.A.; MACKIE, A.; LADHA, S.; PRENTICE, A.; JONES, R. Lipids dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.14, p.1827-32, 1999.

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.1241-52, 1992.

JASKO, D.J.; LITTLE, T.V.; SMITH, K. Objective analysis of stallion sperm motility. **Theriogenology**, v.30 p.1159, 1988.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; ZANEVELD, L.J. Nonbeneficial effects of glycerol on the oocyte penetrating capacity of cryopreserved and incubated human spermatozoa. **Cryobiology**, v.22(5), p.434-7, 1985.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBERGO, C.G.; SOUZA, D.O.; WALD, V.B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R.C. Two dimensional eletrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with sêmen freezability. **Theriogenology**, v.61, p.255-266, 2004.

JUHASZ, J.; NAGY, P.; KULCSAR, M.; HUSZENICZA, G.Y. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: A Review. **ACT. VET. BRNO.**, v.69 p.247-59, 2000.

KAROW, A.M. **Cryobiology 2001 for mammalian embryologists**. Botucatu, 2003. Disponível no site [www.xytex.com.br]. Acesso em 26/02/2003.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.1217-27, 1997.

KATILA, T.; COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Comparation of three containers used for the transport of cooled stallion semen. **Therigenology**, v.48(7), p.1217-27, 1997.

KAZUKO, A.; MASANORI, O.; KOUICHI, T.; YUJI, I. Cryopreservation of Medaka spermatozoa. **Zool. Science**, v.14(4), p.641-4, 1997.

KEITH, S.L., **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa.** Colorado.1998. 104p. Tese. Colorado State University Fort Collins.

KUNDU, C.N.; CHAKRABORLTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G.C. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v.40, p.117-25, 2000.

KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUNDER, G.C. Effect of amino acids on goat epididymal sperm Cryopreservation using a chemically defined model system. **Criobiology**, v.41, p.21-7, 2001.

LAKE, P.E.; RAVIE, O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. **British Poultry Science**, v.25, p.145-50, 1984.

LANDIM-ALVARENGA, F. C.; ALVARENGA, M. A.; GRAHAM, J. K.; SQUIRE, E. L. Viability and ultra structure of stallion spermatozoa cryopreserved with glycerol and DMSO. In: 3rd INTERNATIONAL SYMPOSIUN ON STALLION REPRODUCTION. Fort Collins 2001. **Proceedings...** Fort Collins: Colorado State University, Colorado, 2001. p.61.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Evaluation of acrossomal integrity of stallion criopreserved with amides and glycerol. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.288-91, 2005.

LIMA DIAS, A. **Estudos morfofisiológicos de componentes protéicos para caracterizar diferenças entre espermatozóides do ejaculado e epidídimo, em bovinos**. 2002. 82p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.191-200, 2001.

LOOMIS, P.R.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA- lactose-egg yolk and packaged in straws. **J. Anim. Sci.**, v.56, p.687-93, 1983.

LOVELOCK, J.E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochem. J.**, v.58, p.618-22, 1954.

MAGISTRINI, M.; GUITTON, E.; LEVERN. Y.; NICOLLE, J.C.; VIDAMENT, M.; KERBOEUF, D.; PALMER, E. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. **Theriogenology**, v.48, p.1229-35, 1997.

MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriogenology,** v.48, p.523-30, 1997.

MARQUES, A.L., GOULART, L.R., FELICIANO SILVA,. A.E.D. Variations of protein profiles and calcium and phospholipase A concentrations in thawed bovine semen and their relation to acrossome reaction**. Genetic Mol. Biol., v**.23, n.4, p.825-9, 2000.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **J. Reprod. Fertil Suppl.**, v.27, p.47-51, 1979.

MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium and nonequilibriun freezing of mammalian embryos. **Cell Biophys**, v.17, p.53-92, 1990.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. Proc 9th Int Cong. Animal Reprod and A. I., v.2, p.99-114, 1980.

MAZUR, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likehood of introcular freezing. **J. Gen. Physiol.**, v.47, p.347-69, 1963.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sêmen using different amides. **Theriogenology.** v.58, p.273-76, 2002.

MEDEIROS, A.SL. **Criopreservação de espermatozóides de garanhões utilizando diferentes amidas.**2003. 123p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MEDEIROS, A.S.L.; SILVA JUNIOR, B.L.; MELO, C.M.; CARMO, M.T.; PAPA, F.O.; PUOLI FILHO, J.N.P.; ARAÚJO, G.M.; ALVARENGA, M.A. Utilização do extrato de pituitária eqüina como agente indutor da ovulação em éguas. Publicado no 19th REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIÕES, 2005. **Proceedings…** Angra dos Reis-R.J., Brazil, 2005, v(1) p.195.

MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FAGUNDES, A.C. Congelação de sêmen eqüino em etilenoglico ou glicerol: motilidade, vigor e teste de termo resistência – estudos prelimilares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, Belo Horizonte, 1995. **Proceedings…**Belo Horizonte, 1995. p.290.

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

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

MOORE A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**. v.63(9) p.2372-81, 2005.

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

MULDREW, K.; MC GANN, M. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. **Biophys. J**., v.66, p.532-41, 1994**.**

MULLER, K.; THOMAS, P.; MULLER, P.; HERMAN, A. Stability of transbilayer phospholipids asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. **Journal of Cell Science**. v.120, p.11-20, 1999.

MULLER, Z**.** Fertility of frozen semen**. J. Reprod. Fert.**, suppl.32, p.47-51, 1987.

MULLER, Z**.** Practialities of insemination of mares with deep-frozen semen. **J. Reprod. Fert.**, Suppl.35, p.121-5, 1987.

MURDOCH, R.N.; JONES, R.C. The effects of glycerol on the metabolism and ultrastructure of boar spermatozoa. **J. Reprod. Fert**., v.54, p.419-22, 1978.

MURTHY, S.S.N. Some insight into the physical basis of the cryoprotective action of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol. **Cryobiology**, v.36, p.84-96, 1998.

NAGASE, H.; TOMIZUCA, T.; HANADA, A.; HOSODA, T.; MORIMOTO, H. Cryoprotective action of some amides on spermatozoa of domestics animals. I. Effects of formamide, acetamide and lactamide on the motility of bovine spermatozoa after pellet freezing. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v.18, n.1, p.15-21, 1972.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERUMAN, H. T. **Cryobiology**. New York: Academic Press., p.179-220, 1966.

NEVES NETO, J.R., MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A. Fertilidade do sêmen congelado eqüino em etilenoglicol e glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, Belo Horizonte, 1995. **Proceedings...** Belo Horizonte, 1995. p.292.

NEVES, A.P.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; TREIN, C.R.; MALSCHITZKY, E.; JOBIN, M.I.M.; MATTOS, R.C. Reproductive parameters and sperm freezability of stallion of the Brazilian pony breed. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.67-9., 2006.

OEHNINGER, S.; DURU, N.K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.169, p.3-10, 2000.

OGIER DE BAULNY, B.; LABBÉ, C.; MAISSE, G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of European Catfish (Silurus glanis) testicular espermatozoa after freezing with different crioprotectants. **Cryobiology**, v.39, p.177-84. 1999.

OGIER DE BAULNY, B.; LE VERNE, Y.; KERBOEUF, D.; MAISSE, G. Flow Cytometric Evaluation of Mitochondrial Activity and Membrane Integrity in Fresh and Cryopreserved Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss) Spermatozoa. **Cryobiology**, v.34, p.141-9, 1997.

PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J. Effect of insemination, number of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.23, p.115-21, 1975.

PANAYOTA, N.Z.Z.; ASLANIS, P.; ZAVOS, P.M.; CORREA, J.R; ANTIPAS, S. Occurence of osmotis shock in human spermatozoa: its effects on the

qualitative measurements of frozen- thawed spermatozoa. **Middle East Fertility Society Journal**, v.3, n.1, p.66-72, 1998.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Inseminação Artificial com sêmen a fresco. **Revista do Cavalo Mangalarga**, v.12, p.16-23, 1987.

PAPA, F.O.; CAMPOS FILHO, E.P.; ALVARENGA, M.A. Influencia da forma de acondicionamento sobre a integridade acrossomica e termo resistência do sêmen congelado eqüino. **Anais...** IX CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Belo Horizonte- MG, p.456, 1991.

PAPA, F.O.; DELL`AQUA Jr, J.A. Efeito dotipo de envasamento e método de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade do sêmen congelado eqüino.. **In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 14, 2001, Belo Horizonte. Anais...v.25, n.3, p.458-60, 2001.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-22, 1992.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotrofic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membrane. **Cryobilogy**, v.29, n.2, p.255-66, 1992.

PASQUINE, D.F; FERREIRA, H.N.; PAPA, F.O.; DELL AQUA JR, J.A.; ALVARENGA, M.A. Parâmetros espermáticos pós – descongelação entre três dos diluidores mais utilizados no mundo para sêmen eqüino. **Acta Scientiae Veterinariae**.v.35, p.1005, 2007

PETRUNKINA, A.M; GROPER, B.; GUNZEL-APEL, A.R.; EDDA, T. P.; Functional significance of cell volume for detecting sperm membrane changes and predicting freezability in dog semen. **Reproduction.** v.128, p.829-42, 2004.

PETRUNKINA, A.M.; HEDEL, M.; WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; TOPFER-PETERSEN, E. Requirement for an intact cytoskeleton for volume regulation in boar spermatozoa. **Reproduction.** v.127, p.105-115, 2004.

PETRUNKINA, A.M. Basics aspects of gamete Cryobiology. **J. Reproduktionsmed endokrinol.**, v.4(2), p.78-91, 2007.

PHILLIPS, J.J.; BRAMWELL, R.K.; GRAHAM, J.K. Criopreservation of rooster sperm using methyl cellulose. **Poult. Sci**., v.75, n.7, p.915-23, 1996.

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

ROWE, A.W. Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing. **Cryobiology**, v.3, p.12-8, 1966.

RUTTLAND, J.; POMMER, A.C.; MEYERS, S.A. Omotic tolerance and properties of rhesus monkey (Macaca mullata) spermatozoa. **Journal of Andrology.** v.24(4), p.534-41, 2003.

SAS. Institute Inc. **SAS/STAT user's guide.** version 6. v. 2. 4.ed. Cary: SAS Institute, 1989. 846 p.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

SAMPER, J.C., MORRIS, C.A. Current methods for stallion semen crypreservation: a survey. ***Theriogenology***, v.49, p.895-903, 1998.

SEXTON, T.J. Relationship of the method of addition and temperature of cryoprotective agents to the fertilizing capacity of cooled chicken spermatozoa. **Poultry Science**, v.54, n.3, p.845-8, 1975.

SMITH, A.U.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperature. **Nature**, v.166, p.668-9, 1950.

SONGSASEN, N.; YU, I.; MURTON, S.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. **Cryobiology**, v.44, p.79-90, 2002.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.L.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. ***Cooled and Frozen Stallion Semen*. Fort Collins: animal Reproduction and Biotechnology laboratory, 1999.** (Apostila).

SZTEIN, J.M; NOBLE, K.; FARLEY, J.S.; MOBRAATEN, L.E. Comparasion of Permeating and Nonpermeating Cryoprotectants for Mouse Sperm Cryopreservation. **Criobiology**, v.41, p.28-39, 2001.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETE, J.M.; MARCHAL C.E. Effect of crypreservation on bovine sperm organelle function and viability as determinaded by flow citimetry. **Biology Reproduction,** v.58 (3), p.786-93, 1998.

THURSTON, L.M.; SIGGINS, K.; MILEHAM, A.J.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Identification of amplified restriction fragment lenth polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cyopreservation. **Biology Reproduction**. v.66, p.545-554., 2002.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LE LANNOU, D.; BARRIÉRE, P.; TAINTURIER, D. Improvement of motility of post- thaw Poito jackass sperm using glutamine. **Theriogenology**, v.45, p.1015-27, 1996.

TRIMECHE, A.; YVON, J.M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Effects of glutamine, proline, histiine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.52, p.181-91, 1999.

TSELUTIN, K.; NARIBINA, L.; MAVRODINA, T.; TUR, B. Cryopreservation of poultry semen. **British Poultry Science**, v.36, p.805-11, 1995.

TSELUTIN, K.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. Comparation of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. **Poultry Science**, v.78, p.586-90, 1999.

VARNER, D.D.; VAUGHAN, S.D.; JOHNSON, L. Use of a computadorized system for evaluation of equine spermatozoa motility. **Am. J. Vet. Research.**, v.52, p.224-9, 1991.

VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factros affecting of frozen satallion semen.**Theriogenology.** v.89, p.115-36, 2005.

VIDAMENT , M.; VINCENT, P.; YVON, J.M.; BRUNEAU, B.; MAR, F.X. Glycerol in semen extender is a limiting factor in the fertility in asine and equine species**. Animal Reproduction Science,** v.89, p.302-05, 2005.

VIDAMENT, M.; DAIRE, J.M; 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.1-3, 2002.

VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen freezability and fertility fiel results. **Theriogenology**, v.48, p.907-17, 1997.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addtion of glycerol at 22ºC instead of 4ºC improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.907-19, 2000.

VIDAMENT, M.;YVON, J.M.; COUTY,I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTRON, S.; LE TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.201-18, 2001.

VILEN, R. **Efeito da estabilização a 5^{o}C e curvas de congelação com a utilização de crioprotetores a base de amidas em sêmen de garanhões**. Botucatu, 2004. 69p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

VISHWANATH, R., SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.23-53, 2000.

VISKANTA, R.; BIANCHI, M.V.A.; CRITSER, J.K.; GAO, D. Solidification processes of solutions. **Cryobiology**, v.34, p.348-62, 1997.

WATERHOUSE, K.E.; HOFMO, P.O.; TVERDAL, A.; MILLER JR, R.R. Within and betwenn breed diffrences in freezing tolerance and plasm membrane fatty acid composition of boar sperm. **Reproduction**. v.131, p.887-94, 2006.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p.871-91, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reprodution Science**, v.60-1, p.481-92, 2000.

WATSON, P**.** F. The preservation of semen in mammals. In: FINN, C. A. **Oxford reviews of reproductive biology**. New York: Oxford Univ Press., v.1, p.283-330, 1979.

WATSON, P.F.; MARTIN, I.C. Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrossomal structures of frozen ram spermatozoa. **Aust. J. Biol. Sci**., v.28, n.2, p.153-9, 1975.

WATSON. P.F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil Dev.**, v.7, p.871-91, 1995.

WEISS, S.; JANETT, F.; BURGER, D.; HÃSSIG, M.; THUN, R. The influence of centrifugation on quality and freezability of stallion semen. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v.146(6), p.285-93, 2004.

WILLOUGHBY, C.E.; MAZUR, P.; PETER, A.T.; CRITSER, J.K. Osmotic tolerance limits and properies of murines spermatozoa. **Biology Reproduction**. v.55, p.715-27, 1996.

WOLF, J.; BRYANT, G. Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane solute-water system. (Review). **Cryobiology**, v.39 p.103-29, 1999.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane-solute-water systems. (Review). **Cryobilogy**, v.39, p.103-29, 1999.

WOWK, B.; DARWIN, M.; HARRIS, S.B.; RUSSEL, S.R.; RASH, C.M. Effects of solutes methoxilation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions. **Cryobiology**, v.39, p.215-27, 1999.

YEUNG, C.H.; WAGENFELD, A.; NIESCHLAG, E.; COOPER, T.G. The cause of infertility of male c-ros tyrosine kinase receptor knockout mice. **Biology Reproduction.** v.63, p.612-18, 2000.

YEUNG, C.H.; COOPERS, T.G. Effects of the ion-channel blocker quinine o human sperm volume, kinetics and mucus penetration, and the involvement of potassion channels. **Mol. Human Reproduction.** v.7, p.819-28, 2001.

YLDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v.54, p.579-85, 2000.

YUKSEL, A.; GILMORE, J.; BYERS, M.; WOODS, E.J.; LIU, J.; CRITSER, J.K. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. **Biology Reproduction**. v.67, p.1493-501, 2002.

YUKSEL, A.; LIU, J.; MULLEN, S.; JOHNSON-WARD, J.; GOULD, K.; CHAN, A.; CRITSER, J. Chimpanzee (Pan troglodytes) spermatozoa Osmotic tolerance and cryoprotectant permeability characteristics. **Journal of Andrology**. v.26, p.470-77, 2005.

ZAHN, F.S. **Efeito da incorporação de colesterol na membrana plasmática de espermatozóides sobre os parâmetros espermáticos e índice de fertilidade do sêmen congelado na espécie eqüina**. Botucatu, 2001. 109p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ZAHN, S.F. **Avaliação dos constituintes bioquímicos e protéicos do plasma seminal e do soro sanguíneo e das proteínas de membrana espermática e sua correlação com a qualidade do sêmen congelado em garanhões**. Botucatu, 2006. 116p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Botucatu, 1998. 121p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

ANEXO 1 - Motilidade total (MT) e Motilidade progressiva (MP) computadorizada e Integridade de membrana (INT), pós – descongelação quando da utilização dos crioprotetores a 5% (v/v): dimetilacetamida (DA), metilformamida (MF), dimetilformamida (DF) e glicerol (GL), na seleção dos garanhões utilizados no experimento.

	MT DA	MT MF	MTDF5	MTGL	MPDA	MPMF	MPDF	MPGL	INTDA	INTMF	INTDF	INTGL
G1WST	39	69	59	47	7	25	14	16	33	40	44	17
G2WST	41	65	70	43	8	29	18	14	54	48	65	32
G3WST	30	58	42	47	15	30	17	17	24	45	31	26
G4WST▲	59	57	72	66	24	20	27	23	51	36	23	38
G5AR	78	80	87	70	37	39	46	30	34	38	31	15
G6WST	76	78	75	37	32	33	33	25	50	55	31	43
G7BH	43	56	61	58	9	18	15	28	38	65	63	26
G8BH▲	75	89	77	79	31	47	33	32	26	43	46	39
G9AR	74	71	75	36	12	30	26	14	26	25	22	12
G10BH	65	74	76	21	10	24	24	15	56	35	25	15
G11WST▲	81	82	80	54	24	37	32	20	50	55	51	38
G12QM	37	55	55	30	20	19	18	19	25	39	51	19
G13QM	15	61	54	69	2	19	8	26	10	57	19	25
G14WST▲	57	75	57	51	17	24	19	18	28	49	43	36
G15CAMP	35	40	42	27	12	21	15	11	20	33	30	12
G16CAMP	32	48	50	26	17	20	19	21	18	27	32	17
G20 MM▼	3	48	35	01	0	8	3	0	28	25	24	02
G21MM	54	55	57	08	9	18	12	2	42	14	33	21
G22MM▼	14	16	12	06	5	5	2	2	13	40	42	02
G23MM	25	15	57	01	4	4	11	0	22	27	38	11
G25MM	40	19	38	18	15	8	15	5	22	18	25	09
G26MM	26	44	41	23	4	16	7	9	21	25	32	28
G30MM▼	52	45	66	00	9	11	13	0	28	32	27	02
G31MM▼	17	15	16	00	2	3	3	0	18	17	12	02
G32MM▼	36	38	32	02	8	16	8	0	25	28	26	01
G33MM▼	69	37	52	00	19	16	19	0	53	38	39	03
G34MM	15	30	20	07	2	9	3	1	15	18	21	12

Congelabilidade Aceitável

Congelabilidade não Aceitável

▲ Alta Congelabilidade

▼ Baixa Congelabilidade

ANEXO 2 - Soluções de estoque para a utilização na técnica de fluorescência para avaliação de integridade de membrana.

Soluções	**Constituintes**	**Quantidades**
Estoque IP	Iodeto de Propídio*	10mg
	Solução Fisiológica	20ml
Estoque CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína**	9,2mg
	Dimetilsulfóxido	20ml
Estoque de Formaldeído	Formalina 40%	1ml
	Solução Fisiológica	79ml
Estoque de Citrato de Sódio	Citrato de Sódio	3g
	Solução Fisiológica	100ml

ANEXO 3 - Solução de Trabalho para coloração fluorescente.

Solução	**Quantidade**
Solução de Citrato de Sódio 3%	0,96ml
Solução de Formaldeído	10µl
Solução de Iodeto de Propídio	10µl
Solução de Carboxifluoresceína	20µl

ANEXO 4 – PROTOCOLO DE FLUORESCÊNCIA DAS COMBINAÇÕES DE SONDAS FLURESCENTES

FITC-PSA (L-0770, sigma)

DILUIÇÃO 1 – SOLUÇÃO DE AZIDA DE Na	
AZIDA DE Na	200 mg
PBS	20,0 mL

DILUIÇÃO 2 – SOLUÇÃO TRABALHO (100 □g/mL)	
SOLUÇÃO DE AZIDA DE Na	20,0 mL
FITC-PSA	2 mg

Estocar na geladeira

Iodeto de Propídio (28,707-5, sigma)

SOLUÇÃO TRABALHO (500 □g/mL) – PAPA	
IODETO DE PROPÍDIO	5 mg
PBS	10,0 mL

Estocar no freezer

JC-1 (T3168, molecular probes)

DILUIÇÃO 1 – SOLUÇÃO ESTOQUE (7650 μM)	
JC-1	**5 mg**
DMSO	**1,0 mL**

DILUIÇÃO 2 – SOLUÇÃO TRABALHO (76,5 μM)	
SOLUÇÃO ESTOQUE	**50 μL**
DMSO	**4950 μL**

Estocar no freezer

PROTOCOLO TRABALHO

PROTOCOLO EQUINOS	
Sêmen [ ] 50 x 10^6/mL	**150 μL**
PI	**2 μL**
JC-1	**6 μL AGUARDAR 20-30 min**
FITC-PSA	**50-80 μL**

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo