

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EQÜINOS COMPARANDO
DUAS CURVAS DE CONGELAMENTO COMBINADAS COM DILUENTES
COMERCIAIS: UMA ANÁLISE LABORATORIAL.**

PAULA BARROS TERRACIANO

PORTO ALEGRE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EQUÍNOS COMPARANDO
DUAS CURVAS DE CONGELAMENTO COMBINADAS COM DILUENTES
COMERCIAIS: UMA ANÁLISE LABORATORIAL.**

Autor: Paula Barros Terraciano

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Reprodução Animal, sob a orientação da Pof^a. Dr^a. Elizabeth Obino Cirne Lima e co-orientação da Prof^a. Dr^a. Eneider Rosana Oberst.

PORTO ALEGRE

2008

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por acreditar em mim nesta jornada.

Ao meu pai e meu irmão, por me mostrarem que a distância não é um grande empecilho.

Ao Diego, meu namorado, por aceitar o meu amor e oferecer-me o dele.

Às minhas grandes amigas, Ana Paz e Ana Ayala, por enriquecerem o nosso local de trabalho.

À minha “filha”, Ludmila, pela grande ajuda dispensada durante todo este caminho.

À Prof^ª Dr^ª Elizabeth Obino Cirne Lima, minha orientadora, por me receber tão bem em seu laboratório, me apoiar em todas as horas e me mostrar que é possível fazer muitos trabalhos bem feitos.

À Prof^ª. Dr^ª Enefer Rosana Oberst, minha co-orientadora, por ser tão solícita, inclusive aos domingos e enriquecer muito o nosso trabalho.

Ao PPGCV/ CAPES por terem viabilizado e financiado este projeto.

À Secretaria do PPGVET, pela disponibilidade e presteza.

Ao médico veterinário Ivan Cunha Bustamante Filho pela fundamental ajuda na realização deste trabalho.

À Professora Vera Wald, pela colaboração na análise estatística destes resultados.

Aos colegas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular- CP/HCPA, que estiveram presentes em todas as horas.

Ao Laboratório de Inseminação Artificial-FAVET/UFRGS, coordenado pelas Professoras Enefer Oberst e Maria Inês Jobim, por terem me recebido de forma tão agradável.

Ao REPROLAB- FAVET/UFRGS, por ter me aberto as portas e pelas inúmeras contribuições ao trabalho.

Ao Serviço de Reprodução Assistida- CCA/HCPA, por contribuir imensamente no meu crescimento profissional e ceder o Freeze Control[®] para a realização dos congelamentos das amostras deste trabalho.

RESUMO

Criopreservação de espermatozóides eqüinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial.

Palavras-chave: sêmen, eqüino, criopreservação, espermatozóide, fertilidade

RESUMO

Durante o processo de criopreservação de sêmen, os espermatozóides sofrem alguns danos que resultam na diminuição da fertilidade deste. O presente estudo foi realizado a fim de avaliar o efeito da utilização, combinada de duas curvas de congelamento com dois diluentes comerciais sobre a criopreservação de sêmen eqüino. Foram analisados 20 ejaculados. As amostras foram avaliadas, pela motilidade progressiva e total do sêmen pós-descongelamento e pela integridade e funcionalidade da membrana dos espermatozóides. A combinação entre curva automatizada e Botu-Crio[®] apresentou as maiores médias, nas análises de motilidade total (55,53%) e progressiva (17,25%), após o descongelamento. O diluente Botu-Crio[®], isoladamente, apresentou também os melhores resultados quando foram realizadas as análises de integridade (CFDA/PI) e funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico.

ABSTRACT

Cryopreservation of equine spermatozoa comparing different freezing rates combined with comercial extenders: laboratorial analysis

Key-words: semen, equine, cryopreservation, sperm cell, fertility

ABSTRACT

During semen cryopreservation, sperm cells were submitted to some deleterious events leading to membrane damage which result in fertility decrease. This study was designed to compare the effects of two freezing techniques (conventional and automated), their freezing rates and the use of two commercial extenders as cryoprotectants (FR-5[®] and Botu-Crio[®]) on the total and progressive motility, integrity and functionality of spermatic membranes during the cryopreservation of equine semen. Twenty ejaculates were analyzed. The total and progressive motility of fresh and post-thawing semen samples were evaluated by the patterns assays. The function of plasmatic membrane was measured by the hipoosmotic swelling test. The integrity of plasmatic membrane was evaluated using CFDA/PI fluorescent probes. There were significant differences between the two freezing techniques and/or between cryoprotectants for all assessed parameters. The combined used between Botu-Crio[®] and automated curves showed better results in total and progressive post-thawing motility. The extender Botu-Crio[®], alone, showed better results in order to preserve the membrane integrity and function.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - graus Celsius

cm- centímetro

µL- microlitros

CFDA - diacetato de carboxifluoresceína

DMSO - dimetil sulfóxido

DNA - ácido desoxirribonucléico

g- gravidade

HOST- teste hiposmótico

kg- quilograma

LDL- lipoproteínas de baixa densidade

mL-mililitros

mM- milimolar

mOsmol- miliosmol

MP- motilidade progressiva

MT- motilidade total

PI- iodeto de propídio

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO GERAL DA LITERATURA	10
2.1 O Espermatozóide	10
2.2 Membrana Plasmática	10
2.3 Princípios da Criopreservação	11
2.4 Danos à célula espermática inerentes a criopreservação	13
2.5 Curvas de congelamento	14
2.6 Crioprotetores	14
2.6.1 Mecanismo de ação dos crioprotetores.....	15
2.6.1.1 Crioprotetores não penetrantes.....	15
2.6.1.2 Crioprotetores penetrantes.....	17
2.7. Métodos de avaliação do sêmen	19
2.7.1. Motilidade espermática.....	20
2.7.2. Funcionalidade da membrana.....	21
2.7.3. Integridade de membrana.....	22
3 ARTIGO	23
4 DISCUSSÃO GERAL	35
5 REFERÊNCIAS	42

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen eqüino é de fundamental importância. Possibilita a preservação de material genético, através da constituição de bancos de sêmen e auxilia na promoção do melhoramento da espécie, já que determinadas características genéticas ou funcionais podem ser agregadas ao rebanho eqüino através da re-introdução, manutenção ou sugestão de exclusão de sêmen de um determinado animal, que transmita características indesejáveis aos seus produtos. Permite a utilização do reprodutor em éguas que estejam localizadas em regiões distantes deste, viabilizando a inseminação artificial com sêmen congelado; promovendo o aquecimento ou abertura de novos mercados; uma vez que o uso de sêmen eqüino congelado para inseminação artificial é aceito por poucas Associações de raças de eqüinos até o momento. Ainda viabiliza a racionalização do uso de garanhões nas estações de monta; facilita o controle de doenças sexualmente transmissíveis; assim como, proporciona um maior aproveitamento de animais de grande valor econômico e zootécnico. Paralelamente, promove um incremento no domínio das técnicas de criopreservação de sêmen eqüino e também na eficiência das biotécnicas relacionadas com a reprodução da espécie.

Com a utilização dos protocolos de criopreservação de sêmen eqüino, disponíveis no momento, os índices de fertilidade obtidos ainda são baixos, quando comparado aos resultados da utilização de sêmen fresco ou resfriado (MARSHBURN, 1992; SAMPER; MORRIS, 1998; WATSON, 2000), o que dificulta a utilização de amostras de sêmen congelado em larga escala (AMANN; PICKETT, 1987; ALVARENGA; LEÃO, 2002; HENRY *et al.*, 2002).

Com o intuito de otimizar a taxa de congelamento-descongelamento, diminuir o dano celular e aumentar a eficácia da técnica, várias pesquisas analisando diferentes métodos de criopreservação de sêmen eqüino vêm sendo realizadas, tais como a utilização de novos crioprotetores; a combinação de diferentes crioprotetores classicamente utilizados; a utilização de diferentes curvas de congelamento automatizadas ou não, assim como a criopreservação com diferentes concentrações de espermatozoides por dose. Apesar dos estudos mencionados acima, as taxas de fertilidade de sêmen eqüino congelado-descongelado ainda são muito reduzidas, desencorajando a adoção desta técnica. Entretanto, um aumento significativo no uso de sêmen eqüino congelado vem sendo visto nos últimos cinco anos. Esse aumento se deve

ao fato de que muitas Associações de criadores estão aceitando e registrando produtos oriundos de inseminação artificial com sêmen congelado (MOORE *et al.*, 2006).

O presente estudo teve como objetivos avaliar o efeito da criopreservação de sêmen eqüino, comparando duas técnicas: a técnica de criopreservação convencional em caixa de isopor, onde as palhetas são congeladas sob vapor de nitrogênio líquido (MARTIN *et al.*, 1979), utilizada a campo com uma curva automatizada realizada em um congelador programável descrita por Spreckels (1994), cada qual com uma curva de indução de decréscimo de temperatura específico. Além das diferentes técnicas foram utilizados dois tipos diferentes de diluentes comerciais de sêmen (Extender FR-5[®] e Botu-Crio[®]) combinados com as técnicas de congelamento, a fim de avaliar a influência das diferentes curvas de congelamento e diferentes diluentes sobre a motilidade espermática total, motilidade espermática progressiva e integridade e funcionalidade das membranas espermáticas. Para realizar tais análises, as amostras de sêmen descongeladas foram submetidas às análises padrão de motilidade total e progressiva bem como às técnicas de coloração com corantes fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (PI) e ao teste hiposmótico (HOST).

O presente estudo teve como objetivo:

- 1) Avaliar e comparar o efeito da criopreservação de sêmen eqüino utilizando as técnicas de criopreservação convencional e a técnica com auxílio de um congelador programável; com diferentes diluentes comerciais sobre as características físicas e químicas do sêmen.

2 REVISÃO GERAL DA LITERATURA

2.1 O Espermatozóide

A ultra-estrutura do espermatozóide eqüino é similar aos espermatozóides das outras espécies de mamíferos domésticos (BARTH; OKO, 1989). O espermatozóide é formado por três regiões altamente especializadas: a cabeça que acomoda o DNA da célula, estrutura vital durante a interação espermatozóide oócito; a peça intermediária, envolvida na produção de energia por acomodar as mitocôndrias e o flagelo, que está envolvido com a motilidade espermática (EDDY, 1988). Essas três regiões são recobertas pela membrana plasmática (AMANN; GRAHAM, 1993).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para a sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóide para o oócito, onde a união dos pronúcleos masculino e feminino ocorre, produzindo o zigoto (EDDY; O' BRIEN, 1994). Desta forma, a função principal da cabeça do espermatozóide é a liberação de uma série haplóide de cromossomos pra o oócito; enquanto, a do flagelo é promover motilidade à célula para permitir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e a penetração através da zona pelúcida do oócito (MORTIMER, 1997).

2.2 Membrana Plasmática

A membrana plasmática é formada por duas camadas lipídicas, contendo moléculas de fosfolipídios polares, distribuídos assimetricamente, de propriedades anfipáticas, todas orientadas de maneira que a porção hidrofóbica fique direcionada para o centro da membrana e a porção hidrofílica para a superfície da membrana. Os principais lipídeos presentes nesta estrutura celular são fosfolipídeos como, colina, serina, glicerol e inositol, glicoesfingolipídeos e esteróides. As células espermáticas na espécie eqüina possuem uma composição incomum de organização de lipídeos na membrana plasmática. Esta é repleta de fosfolipídeos poliinsaturados que podem compensar perdas de colesterol. Os fosfolipídeos poliinsaturados são mais flexíveis que

os saturados e podem, portanto, manter a dinâmica característica de bicamada lipídica desta membrana (FLESCHE; GADELLA, 2000).

À temperatura corpórea, a membrana plasmática apresenta-se na forma de um mosaico fluido onde as proteínas estão livres para moverem-se entre os fosfolipídeos bilaterais, uma vez que a própria função requer que as proteínas estejam aptas para moverem-se dentro da membrana (JASKO, 1994), o que a torna uma estrutura extremamente dinâmica (GADELLA *et al.*, 2001).

Os principais fatores que afetam esta fluidez são a composição relativa entre fosfolipídeos e colesterol e a temperatura à qual a membrana é exposta (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990). A manutenção do estado líquido dos lipídeos e das proteínas da membrana permite a movimentação livre dos componentes, o que garante suas interações (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990; FLESCHE; GADELLA, 2000); ou seja, lipídeo-lipídeo, lipídeo-proteína. Essas interações são a base para ordenar os domínios na membrana, resultando na compartimentalização da membrana plasmática; e a manutenção desses domínios é essencial para a funcionalidade espermática (PARKS; GRAHAM, 1992).

A membrana plasmática dos espermatozoides de mamíferos tem uma pronunciada organização de domínios com muitos antígenos glicoprotéicos (WOLFE *et al.*, 1998), sendo subdividida em domínios regionais bem delineados que diferem em função e composição. Na cabeça do espermatozoide, a membrana plasmática possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-acrossomal. Na região acrossomal a membrana plasmática pode ser subdividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial. Os segmentos marginal e principal, juntos, são denominados de capa acrossomal. A membrana plasmática do flagelo é separada em domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial, e domínio da cauda posterior, que cobre as peças principal e terminal da cauda (EDDY; O'BRIEN, 1994).

2.3 Princípios da Criopreservação

Durante o processo de criopreservação, o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37° a 20° C), o que parece não ocasionar

danos aos espermatozóides quando estes se encontram diluídos em meio adequado (KEITH, 1998). O estresse inicial se dá quando o espermatozóide passa da temperatura corporal para 5°C (SQUIRES *et al.*, 1999). Isto se dá devido à fase de transição da membrana plasmática, do estado líquido cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS, 2002). Este efeito pode ser minimizado pelo controle da taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19° a 8° C, pela adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente (GRAHAM, 1996), além do uso de curvas de resfriamento lentas. Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, as células sofrem um fenômeno conhecido como choque térmico, o qual induz danos irreversíveis aos espermatozóides, que se caracterizam por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou retrógrado), perda rápida de motilidade, danos do metabolismo, da membrana plasmática e do acrossoma (GRAHAM, 1996; SQUIRES, 1999).

Durante o processo de congelamento, a suspensão de espermatozóides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super resfriamento), antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar, ocorre um aumento na temperatura que é necessário para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para o espermatozóide, sendo minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelamento (SQUIRES, 1999). A temperaturas em torno de 5°C a água intra e extracelular permanece super resfriada e não cristaliza. Entre -5° a -10°C começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular que permanece super resfriado, ocorre troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular ocasionando a desidratação celular. Neste ponto, a curva de congelamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. Uma desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (MEDEIROS, 2002).

A perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de se formarem grandes canais de gelo dentro da célula que causariam danos as estruturas internas e/ou a membrana plasmática (SQUIRES, 1999).

2.4 Danos a Célula Espermática Inerentes a Criopreservação

Os danos causados ao espermatozóide durante o processo de criopreservação podem resultar na redução da proporção de espermatozóides viáveis, assim como na capacidade funcional destes (GRAHAM,1996; SQUIRES,1999; WATSON, 2000; MEDEIROS, 2002). As lesões ocasionadas pelo processo de congelamento têm sido atribuídas às mudanças de temperatura, formação de cristais de gelo, danos oxidativos, alterações na membrana do espermatozóide e em seu DNA, toxicidade do crioprotetores e ao estresse osmótico (WATSON, 2000). A célula espermática é sensível ao estresse osmótico associado à adição e remoção de crioprotetores, assim como as alterações na concentração de soluto durante o congelamento (WATSON, 2000).

Os efeitos deletérios dos crioprotetores estão relacionados a diversos fatores, dentre os quais, o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, a indução da fusão da mesma, além da inibição da atividade enzimática (FAHY, 1996). Sua toxicidade pode resultar em desnaturação de proteínas e as alterações das interações da actina (FAHY, 1990). O glicerol, crioprotetor amplamente utilizado, induz mudanças nos eventos citoplasmáticos por aumentar a viscosidade ao penetrar a célula espermática, causa alterações na polimerização da tubulina, na associação dos microtúbulos, no balanço bioenergético além de atuar diretamente de modo prejudicial na membrana plasmática, no glicocálix e nas proteínas de superfície celular (HAMMERSTEDT; GRAHAM, 1992).

Devido à permeabilidade da maioria dos agentes crioprotetores ser inferior a da água, ocorre um influxo de água o qual resulta no aumento do volume celular (BALL; VO, 2001). A exposição das células a uma solução hiperosmótica é responsável pela remoção da água intracelular e como conseqüência ocorre o encolhimento celular e o influxo de íons. No entanto, o descongelamento proporciona o efeito inverso; ocorre o influxo de água, que pode acarretar a ruptura da membrana (HOLT, 2000). O espermatozóide dos mamíferos comporta-se como um osmômetro linear, ocorrendo morte celular caso haja entumescimento ou encolhimento do mesmo, quando submetido a níveis superiores da tolerância osmótica espécie-específica. As lesões da membrana plasmática podem também estar relacionadas de maneira secundária ao rápido movimento da água através desta (BALL; VO, 2001).

2.5 Curvas de Congelamento

Normalmente os protocolos de criopreservação de sêmen utilizam curvas de congelamento que vão desde 10 a 100°C por minuto, obtendo-se boas taxas de sobrevivência pós criopreservação (AGCA; CRITSER, 2002). O congelamento em aparelho automatizado foi inicialmente descrito por Almquist e Wiggins (1973), posteriormente Landa e Almquist (1979) aprofundaram os estudos da técnica, não encontrando nenhum efeito negativo da criopreservação de grande número de palhetas no aparelho de congelamento automatizado, sobre a motilidade pós-descongelamento em sêmen bovino.

Por outro lado, uma das questões importantes relacionadas com a eficiência das técnicas de criopreservação é a velocidade de redução da temperatura durante o congelamento. Este tópico tem sido uma das etapas mais importantes no processo de criopreservação, visto que o grau de lesões celulares depende da curva de resfriamento (WATSON, 1995). A sobrevivência dos espermatozóides ao congelamento é reduzida se a taxa de resfriamento usada fica abaixo da temperatura considerada ótima. A região da curva de resfriamento na qual os espermatozóides eqüinos parecem ser mais sensíveis é entre 20° e 8°C (MORAN, 1992). Se as células resfriam muito rapidamente a água intracelular congela produzindo cristais de gelo intracelulares, que danificam as membranas (MOORE, 2006). Entretanto se os espermatozóides são resfriados muito vagorosamente uma desidratação celular excessiva ocorre, causando danos irreversíveis aos compartimentos celulares (MOORE, 2006).

2.6 Crioprotetores

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio para que haja uma proteção do espermatozóide durante a criopreservação e o descongelamento (GRAHAM, 1996; SQUIRES *et. al.*, 1999;ARRUDA, 2000). São importantes para evitar a formação de gelo intracelular (MEDEIROS, 2002). Estes componentes são classificados como penetrantes e não penetrantes ou intra e extracelulares (GRAHAM, 1996; ARRUDA,

2000). Altas concentrações de crioprotetores são deletérias aos espermatozóides devido a sua toxicidade e podem resultar na redução da fertilidade após a inseminação artificial.

2.6.1 Mecanismo de Ação dos Crioprotetores

O modo pelo qual os crioprotetores atuam não se encontra totalmente elucidado. Acredita-se que reduzam o ponto de congelamento da solução, que é determinado como a temperatura em que ocorre a formação dos primeiros cristais de gelo puro.

A estrutura molecular é um parâmetro importante para determinar a eficiência dos crioprotetores, uma vez que possuem afinidade pela água, o que é devido a presença de grupamentos amina e hidroxila em sua composição. Tais grupamentos favorecem a formação de pontes de hidrogênio com as moléculas de água (BAUDOT, *et al.*, 2002). Estas ligações alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando um ambiente menos prejudicial às células (DALIMATA, 1997).

Apesar de imprescindíveis para a sobrevivência dos espermatozóides no processo de congelamento, os crioprotetores possuem efeitos tóxicos para o espermatozóide, tornando algumas substâncias utilizadas na criopreservação de outros tipos celulares impróprias para a célula espermática (WATSON, 2000). Em altas concentrações podem resultar na redução da fertilidade devido à toxicidade, que pode ser ocasionada pela lesão celular, por danos osmóticos e caso se encontrem em altas concentrações, interferir nas interações entre o espermatozóide e o trato reprodutivo da fêmea (GRAHAM, 1996).

2.6.1.1 Crioprotetores Não Penetrantes

Incluem-se nesta categoria os açúcares (lactose, frutose, rafinose ou trealose) e os polímeros sintéticos (metil celulose). Os crioprotetores não penetrantes protegem as células basicamente através de efeitos osmóticos. Em suspensão em um meio hipertônico, as células perdem seu conteúdo de água, o que diminui a possibilidade de

formação de cristais dentro da célula. Estes componentes agem como solutos ou colóides, não servindo como solventes (GRAHAM, 1996).

Algumas substâncias, dentre as quais os lipídeos, proteínas e macromoléculas, são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelamento sem que para isso necessitem penetrar no espermatozóide, são estes a gema de ovo, leite, alguns açúcares e a albumina sérica bovina (KEITH, 1998). A gema de ovo é rotineiramente utilizada nos diluentes para criopreservação de sêmen de mamíferos com o intuito de proteger contra o choque térmico (MOUSSA *et al.*, 2002). Acredita-se que sua ação seja devida à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando a membrana do espermatozóide (MOUSSA *et al.*, 2002), atuando na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolipídeos e aparentemente induzindo a uma alteração transitória de sua composição, conseqüentemente prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTAD, 1996).

Os fosfolipídeos que compõem a fração LDL da gema de ovo protegem o sêmen especificamente durante o processo de resfriamento a 5°C. O uso de fosfatidilserina purificada tem demonstrado proteger as células espermáticas de bodes e touros contra o choque térmico. Lipossomas que compõem o colesterol e a fosfatidilserina protegem o espermatozóide de bovinos e garanhões dos danos do processo de congelamento possivelmente por prevenir das alterações deletérias durante a criopreservação (WILHELM *et al.*, 1996). A prevenção conferida pelos lipídeos com relação ao choque térmico parece estar relacionada a quelação do íon Ca^{+2} do meio, evitando sua entrada no espermatozóide. É possível que os lipossomas interajam com o cálcio e outros componentes do meio de congelamento que afetem a tonicidade ou a fração da água não congelada durante a criopreservação (WILHELM *et al.*, 1996).

Os açúcares atuam através da pressão osmótica na desidratação celular, reduzindo a água passível de ser congelada no interior da célula de modo a reduzir o dano causado pela cristalização de gelo (AISEN, 2002). Além de atuarem como crioprotetores, os açúcares são substrato energético para o espermatozóide durante a incubação (YILDIZ *et al.*, 2000), conferem proteção à membrana plasmática durante o congelamento e o descongelamento, através de interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos, localizados na cabeça dos fosfolipídios. Por restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolipídios, os açúcares podem prevenir os danos

causados pela desidratação extrema. Geralmente, os dissacarídeos, sacarose e trealose, são mais efetivos em estabilizar a bicamada do que os monossacarídeos (DE LEEUW, 1993), mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e manutenção de lipídeos numa fase fluida na ausência de água (ANCHORDOGUY *et al.*, 1987; CROWE *et al.*, 1987).

Alguns aminoácidos como a glutamina, histidina e glicina betaína têm sido utilizados na criopreservação de sêmen de ovinos, garanhões e humanos (KUNDU *et al.*, 2001). O uso de L-glutamina a 80mM acrescido ao diluente INRA82 e glicerol melhorou significativamente a motilidade do sêmen de jumento após descongelamento, não havendo diferença significativa no grupo controle. Os grupos contendo 160mM e 240mM de glutamina tiveram seus valores significativamente mais baixos (TRIMECHE *et al.*, 1996).

2.6.1.2 Crioprotetores Penetrantes

São substâncias que atuam tanto no meio intra como extracelular. Os mais comumente utilizados são o glicerol, o etilenoglicol, o DMSO e as amidas (KEITH, 1998). Watson (1979) sugere que estas substâncias atuem através de propriedade coligativa com a água, ou seja, reduzindo seu ponto de congelamento. Uma solução que contém glicerol, por exemplo, disporá de mais água não congelada do que outra sem o glicerol, aumentando o volume dos canais de solventes não congelados, reduzindo a concentração de sais das porções não congeladas. Portanto, atuam tanto como solvente quanto como soluto.

A descoberta da ação do glicerol foi de grande importância na criopreservação de sêmen, pois até então este evento não era possível (KEITH, 1998; HOLT, 2000) e ainda é o agente mais utilizado nas espécies mamíferas domésticas (FARSTAD, 1996). O glicerol penetra na membrana celular através da difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma (PARKS; GRAHAM, 1992), reduz o estresse osmótico através da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, das interações com íons e macromoléculas, assim como pela redução do ponto de congelamento da água (MEDEIROS *et al.*, 2002).

O uso do glicerol na criopreservação do sêmen eqüino pode estar relacionado à baixa motilidade pós-descongelamento e redução da fertilidade (GOMES *et al.*, 2002). O efeito tóxico do glicerol tem sido relatado por muitos autores (FAHY, 1986; WATSON, 1995; AGCA; CRITSER, 2002) e sua toxicidade parece causar desnaturação das proteínas, alteração nas interações de actina, além de ocasionar mudanças nos eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade pelo glicerol intracelular, modificações na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos, atuação direta na membrana plasmática, alterações no glicocálix e nas proteínas da superfície celular (ALVARENGA *et al.*, 2000 a).

A concentração de glicerol ideal para a sobrevivência do espermatozóide é espécie dependente, e varia de acordo com a curva de congelamento, de outros componentes do diluente e ainda do método de envase. Em bovinos, varia entre 7 a 9%, nos caprinos, de 3 a 4%, em cães varia de 2 a 10% e em humanos é congelado com 5 a 10 % (FARSTAD, 1996). Em eqüinos, existem grandes variações nas concentrações de glicerol utilizadas, mas se considera necessário o uso de um percentual inferior ao utilizado para bovinos (KEITH, 1998). Em estudo comparativo do glicerol e outros crioprotetores, dentre eles etileno glicol, dimetil formamida e dimetil sufóxido, utilizando 10 ejaculados de 10 garanhões, constatou-se a equivalência no uso dos crioprotetores, com exceção do dimetil sufóxido, que determinou resultado inferior (ALVARENGA *et al.*, 2000b). Outro estudo comparativo entre etilenoglicol e glicerol demonstrou atuação semelhante destes, que quando combinados, possibilitou a redução do teor de glicerol, diminuindo o seu efeito tóxico (ALVARENGA *et al.*, 2000 a).

Com relação à fertilidade, o uso de sêmen eqüino criopreservado com etilenoglicol associado a diluente contendo lactose e gema de ovo, resultou em gestação de três das cinco éguas do grupo testado (KOTYAGINA, 1963). Foram reportados índices de 80% de prenhez em éguas inseminadas com sêmen congelado tanto com glicerol, como com etilenoglicol (ROMBE *et al.*, 1965). Estes resultados indicam que o etilenoglicol pode ser usado na criopreservação do espermatozóide eqüino, uma vez que não interfere na sua fertilidade, conforme o referido por Keith (1998).

O dimetilsufóxido é muito usado como crioprotetor, uma vez que penetra rapidamente na membrana plasmática. Para que um soluto atue desta maneira, é necessário que seja solúvel à membrana, assim como em água. Este crioprotetor tem como inconveniente a capacidade de causar alterações na membrana, as quais danificam

e inviabilizam as células, o que torna os crioprotetores penetrantes geralmente tóxicos para as células (WOLFE; BRYANT, 2001).

A dimetilacetamida e o dimetilsufóxido são uma alternativa na criopreservação de sêmen por não apresentarem os efeitos tóxicos do glicerol (BLANCO *et al.*, 2000), sendo estes usados para congelar sêmen de peixes, como também o glicerol, metanol e o propileno glicol (BAUNLY *et al.*, 1999). A dimetilacetamida apresentou resultados superiores quando comparada ao glicerol ou ao dimetilsufóxido no congelamento de espermatozóides de aves, obtendo o mesmo resultado para células espermáticas de trutas, além da fertilidade e da viabilidade serem superiores quando comparadas com o glicerol e o dimetilsufóxido (KEITH, 1998). Dimetilformamida e metilformamida são crioprotetores que vem sendo utilizados com grande sucesso no congelamento de sêmen equino. Seu uso para congelamento de sêmen de garanhões com boa congelabilidade não proporciona aumento da motilidade e sim resultados semelhantes ao glicerol (KEITH, 1998). No entanto, a utilização desses agentes em garanhões com baixa resistência ao processo de criopreservação, manifestou melhores resultados quando comparados com o glicerol (GOMES *et al.*, 2002).

O uso combinado de crioprotetores confere maior proteção em relação ao seu uso isolado (DALIMATA; GRAHAM, 1997). Assim, a associação da dimetilformamida e do glicerol, conforme a composição do meio diluidor MP50, proporcionou uma melhor proteção da célula espermática durante o congelamento, pois além da obtenção de excelentes resultados laboratoriais pós-descongelamento determinou índices de fertilidade superiores aos descritos na literatura. Este diluente combina os dois agentes citados, e também é enriquecido com açúcares e substratos de cultivo celular, como fontes de macromoléculas, além da presença de gema de ovo e leite desnatado, de modo que a associação destes componentes, da dimetilformamida e do glicerol foi extremamente favorável à proteção do espermatozóide equino durante o processo de congelamento (PAPA *et al.*, 2002).

2.7 Métodos de Avaliação do Sêmen

As avaliações *in vitro* do sêmen são de grande importância para a análise das características relacionadas com a capacidade fecundante do espermatozóide, tais como,

a motilidade, a integridade morfológica, a funcionalidade e a integridade da membrana plasmática.

Johnson *et al.* (1996) afirmam que o uso de um único teste para avaliar o potencial fecundante do espermatozóide é ilusório, ao passo que a combinação de vários testes dará maior segurança na estimativa da função espermática.

2.7.1 Motilidade Espermática

A avaliação da motilidade espermática é um dos principais recursos para avaliar os efeitos da criopreservação dos espermatozóides, sendo utilizada em diversos estudos para se obter comparações entre diluentes, métodos de resfriamento e congelamento e diluições utilizadas. Sua observação é considerada um elemento importante na avaliação da função espermática (KENNEY *et al.*, 1983; VARNER *et al.*, 1988; PICKETT, 1993). A motilidade é um componente indispensável no mecanismo da fertilização, e sua perda irreversível resulta na perda da função celular. Por outro lado, sua manutenção não implica integridade celular completa (VARNER *et al.*, 1988) e não tem correlação absoluta com a fertilidade (PACE; SULLIVAN, 1975; BEDFORD *et al.*, 1995; KELLER, 1998). Para melhorar a avaliação da motilidade, muitos pesquisadores têm utilizado diluentes de sêmen, com taxas de diluição de 1:2. Os diluentes de sêmen previnem a aglutinação e reduzem a influência da concentração espermática e do pH seminal sobre a avaliação subjetiva da motilidade (MATTOS, 1995; KELLER, 1998; LAGARES *et al.*, 2000).

O objetivo de se avaliar a motilidade espermática é determinar a porcentagem de espermatozóides que estão vivos dentro de um ejaculado. A motilidade total é definida como a porcentagem de espermatozóides que apresentam movimento circular, pendular, progressivo ou em serpentina.

Para se obter uma avaliação mais confiável, avalia-se também a porcentagem de espermatozóides com motilidade progressiva, pois estes estão relacionados com altos índices de fertilidade (PICKET; VOSS, 1972). Entende-se por motilidade progressiva a porcentagem de células que estão se movimentando ativamente para frente. Incluem-se, também, os espermatozóides com movimentos circulares amplos, devido à alta incidência de implantações abaxiais do colo (BIELANSKI; KACZMARSKI, 1979). O número de espermatozóides com motilidade progressiva, além de se constituir de

critério de avaliação do potencial de fertilidade de um garanhão (KENNEY *et al.*, 1983), também é utilizado para determinar a dose inseminante e maximizar a eficiência reprodutiva de garanhões em programas de inseminação artificial (PICKET; VOSS, 1972).

2.7.2 Funcionalidade da Membrana-Teste Hiposmótico

O teste hiposmótico (HOST) foi inicialmente utilizado para avaliar a função da membrana plasmática e a capacidade de fertilização do espermatozóide humano (JEYENDRAN *et al.*, 1984), e tem sido utilizado para a avaliação espermática em muitas espécies, tais como: bovinos, eqüinos e humanos (CORREA; ZAVOS, 1994; KELLER, 1998; NIE; WENSEL, 2001; CHAN *et al.*, 1988). Geralmente a avaliação é realizada utilizando-se de soluções hiposmóticas de citrato de sódio e frutose. No entanto, Lomeo e Giambérsio (1991) realizaram a avaliação da funcionalidade da membrana espermática em sêmen humano, utilizando água destilada (Water Test). Lagares *et al.* (2000) modificaram a técnica, adaptando-a para o uso em sêmen eqüino.

O teste hiposmótico avalia se as membranas espermáticas são funcionais. As membranas biológicas são responsáveis pela homeostase celular, por meio das trocas realizadas com o meio externo. A membrana forma uma barreira semipermeável para moléculas e serve para manter e modular a composição do meio intracelular. Além disso, a membrana protege a célula contra as influências do ambiente extracelular, tanto no trato genital masculino, até os espermatozoides serem ejaculados, como no trato genital feminino até ocorrer à fertilização. Protege também de influências não fisiológicas, quando os espermatozoides são colocados nos diluentes seminais (EINARSSON, 1992).

Os espermatozoides íntegros mantêm um equilíbrio osmótico com o ambiente em que se encontram. Quando os espermatozoides são expostos às soluções hiposmóticas, aqueles com membrana funcional sofrem aumento de tamanho, no intuito de estabilizar o equilíbrio osmótico, produzindo um inchaço típico na região da cauda e, conseqüentemente, alterações na morfologia espermática. Ao sofrerem o choque osmótico, os espermatozoides tendem a promover um dobramento de cauda, indicando

que possuíam membranas íntegras antes do teste (DREVIUS; ERIKSSON, 1966; DELL' AQUA JÚNIOR *et al.*, 2002).

2.7.3 Integridade da Membrana

Os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a predição de sua capacidade fertilizante. Dentre estes testes, as técnicas que utilizam corantes fluorescentes vem ganhado importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara (CELEGHINI, 2005).

Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática espermática, como o brometo de etídio (BILGILI; RENDEN, 1984), corantes supravitais Hoescht 33258 e 33342 (CASEY, *et al.*, 1993; DE LEEUW *et al.*, 1991; MAXWELL *et al.*, 1997), Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (PI) (GARNER *et al.*, 1986, HARRISON; VICKERS, 1990) A coloração de fluorescência utilizando o CFDA e o PI, desenvolvida para avaliar a integridade estrutural dos espermatozoides, foi baseado na hidrólise que o CFDA sofre ao penetrar os espermatozoides. O processo de hidrólise é desencadeado por esterases não específicas dentro da célula, produzindo carboxifluoresceína livre, que é retida dentro dos espermatozoides quando a membrana plasmática está intacta, produzindo coloração verde fluorescente. A maioria dos espermatozoides com membranas intactas acumula carboxifluoresceína em todos os compartimentos celulares. Quando danificada, a membrana torna-se permeável ao PI, indicando, através da coloração vermelha, a morte espermática (JOHNSON *et al.*, 1996). Este corante tem afinidade pelo núcleo e penetra apenas células com membranas lesadas, ligando-se ao DNA (HARRISON; VICKERS, 1990).

A integridade da membrana plasmática tem sido avaliada em amostras de sêmen criopreservadas de várias espécies animais como suínos (ZOU; YANG, 2000), ovinos (VALCÁRCEL *et al.*, 1994) e eqüinos (ZÚCCARI, 1998). Os resultados da coloração de fluorescência utilizando CFDA e PI têm sido correlacionados com os resultados de motilidade das amostras avaliadas (HARKEMA; BOYLE 1992). Esta correlação foi observada em amostras descongeladas de sêmen eqüino (SNOECK, 2003; BUSTAMANTE, 2006), e ovino (VALCÁRCEL *et al.*, 1994).

3 ARTIGO

Artigo nas normas editoriais para publicação na Revista Ciência Rural – Universidade Estadual de Santa Maria.

Aceito em Abril/2008

Criopreservação de espermatozóides eqüinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial.

Cryopreservation of equine spermatozoa comparing different freezing rates combined with commercial extenders: laboratorial analysis

Paula Barros Terraciano^{I,IV}, Ivan Cunha Bustamante-Filho^{I, II}, Ludmila do Vale Miquelito^I, Tamarini Rodrigues Arlas^{III,IV}, Fabiana Castro^{III}, Rodrigo Costa Mattos^{III,IV}, Eduardo Pandolfi Passos^I, Enefer Rosana Oberst^{II,IV}, Elizabeth Obino Cirne Lima^{I,IV,V}.

RESUMO

Durante o processo de criopreservação de sêmen, os espermatozóides sofrem alguns danos que resultam na diminuição da fertilidade deste. O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da utilização combinada de duas curvas de congelamento com dois diluentes comerciais (FR-5[®] e Botu-Crio[®]) sobre a criopreservação de sêmen eqüino. Foram analisados 20 ejaculados de dois garanhões. As amostras foram avaliadas por microscopia de contraste de fase e microscopia de epifluorescência, observando-se a motilidade progressiva e total do sêmen pós-descongelamento e a integridade e funcionalidade da membrana dos espermatozóides. A combinação entre curva automatizada e Botu-Crio[®] apresentou as maiores médias, nas análises de motilidade total e progressiva, após o descongelamento. O diluente Botu-Crio[®], isoladamente, preservou também as membranas destes, quando foram realizadas as análises de integridade utilizando teste com diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio e funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico.

Palavras-chave: sêmen, eqüino, criopreservação, espermatozóide, crioprotetores

I - Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Centro de Pesquisas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; II - Laboratório de Inseminação Artificial, Faculdade de Veterinária, UFRGS; III – REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS; IV- Programa de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, UFRGS; V- Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS. Autor para correspondência: paulaterraciano@gmail.com - Laboratório de

Embriologia e Diferenciação Celular , Centro de Pesquisas, HCPA - Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903 Porto Alegre, RS.

ABSTRACT

During semen cryopreservation, sperm cells were submitted to several deleterious events leading to membrane damage which result in fertility decrease. This study was designed to compare the effects of two freezing techniques (conventional and automated), and the use of two commercial extenders as cryoprotectants (FR-5[®] and Botu-Crio[®]) on total and progressive motility, integrity and functionality of spermatic membranes during the cryopreservation of equine semen. Twenty ejaculates from two stallions were analyzed. The total and progressive motility of fresh and post-thawing semen samples were evaluated by patterns assays. Function of plasmatic membrane was measured by the hipoosmotic swelling test. Integrity of plasmatic membrane was evaluated using carboxifluorescein diacetate and iodidium propide fluorescent probes. There were significant differences between the two freezing techniques and/or between cryoprotectants for all assessed parameters. The combination of Botu-Crio[®] and automated curves showed better results on total and progressive post-thawing motility. The extender Botu-Crio[®], alone, showed to better preserve the membrane integrity and function.

Keywords: semen, equine, cryopreservation, spermatozoon cell, cryoprotectants

INTRODUÇÃO

A utilização de biotecnologias cada vez mais modernas tem contribuído para o avanço da reprodução de diversas espécies animais, em especial animais de produção. O desenvolvimento de técnicas adequadas para a preservação e o armazenamento de sêmen possibilita melhor aproveitamento de animais de alto valor zootécnico, permitindo o uso da genética de animais que não possam – temporária ou permanentemente – serem utilizados na reprodução, além de permitir o transporte de sêmen a longas distâncias, sendo considerado como o melhor seguro biológico de reprodutores geneticamente superiores. Porém, os índices de fertilidade obtidos com sêmen equino congelado são ainda muito inferiores aos obtidos com sêmen congelado de bovinos, por exemplo, (PARKS & GRAHAM, 1992).

Uma das questões importantes relacionadas com a eficiência das técnicas de criopreservação é a velocidade de redução da temperatura durante o congelamento. O

tipo de curva utilizada no congelamento tem influência direta no grau de lesões celulares, devido a processos de desidratação e formação de cristais de gelo intracelulares (MOORE et al., 2006). Além disso, meios diluentes de sêmen são utilizados com o objetivo de proteger os espermatozóides contra os efeitos deletérios do resfriamento a temperaturas críticas. Entretanto, a criopreservação de sêmen equino não é uma tecnologia estabelecida (ALVARENGA et al., 2005). Nos últimos anos diversas modificações têm sido propostas para a melhoria da técnica como a utilização de diluentes à base de leite em substituição ao ovo (PALMER 1984, VIDAMENT et al., 2001), e a utilização de amidas no lugar do glicerol (VIDAMENT et al., 2001, ALVARENGA et al., 2005). O presente trabalho teve como objetivo demonstrar o efeito de duas diferentes curvas de congelamento combinadas com dois diferentes diluentes comerciais sobre as características funcionais e estruturais dos espermatozóides eqüinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dois garanhões com fertilidade comprovada com seis e trinta anos de idade, um da raça Puro Sangue Inglês e um sem raça definida. Ambos os animais encontravam-se em atividade sexual, com a produção espermática estabilizada, num regime de três coletas semanais. As amostras de sêmen foram coletadas pelo método de vagina artificial, modelo Hannover, com intervalo médio de coletas de três dias, perfazendo um total de 10 coletas por animal. O período de coletas estendeu-se de outubro a dezembro de 2006.

Uma parcela das amostras (1ml) foi reservada para as análises do sêmen fresco e o restante foi processado para o congelamento. Após a coleta, a fração gel foi desprezada e o sêmen foi filtrado em gaze estéril. A seguir as amostras foram avaliadas em microscópio de contraste de fase (200 x) quanto à motilidade progressiva (MP) e à motilidade total (MT), 20µl de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37° C, sobre mesa térmica. A avaliação da MP e da MT foi realizada de forma subjetiva, pelo mesmo observador, conforme definição de KENNEY et al. (1983).

Para a análise da integridade física da membrana, 400µl de sêmen foram incubados com 3µl de iodeto de propídio (PI) e 2µl de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), a 37°C por 8 minutos. A amostra foi avaliada por microscopia de epifluorescência, em aumento de 1000 x, sob imersão. Um total de 100 espermatozóides

por amostra foi avaliado. Foram considerados íntegros aqueles espermatozóides que apresentaram coloração verde (HARKEMA & BOYLE, 1992).

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico. Para tanto, 200 µL de água destilada foram adicionados a 100µL de sêmen (osmolaridade: 100 mOsmol/kg). As amostras foram incubadas a 37° C por oito minutos, conforme descrito por LOMEIO & GIAMBERSIO (1991), modificado por LAGARES et al. (2000). Posteriormente, amostras de sêmen foram analisadas em microscópio de contraste de fase em aumento de 400 x. Foram avaliados 100 espermatozóides por amostra e foram considerados íntegros os espermatozóides que promoveram um enrolamento da cauda (LOMEO & GIAMBERSIO, 1991).

Paralelamente à realização das análises das amostras de sêmen fresco, cada ejaculado foi dividido em duas frações, que foram diluídas 1:1 (v: v), com os diluentes de centrifugação comerciais FR-1[®] (Nutricell-Rua Dimas de Toledo Piza, 521, - Campinas, SP) ou Botu-Sêmen[®] (Biotech Botucatu, João Passos 573, Botucatu-SP) à temperatura de 37° C. As amostras foram centrifugadas a 650 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspenso com os diluentes estudados. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer. Cada ejaculado coletado foi fracionado em duas alíquotas, que foram diluídas nos dois diferentes diluentes. Depois, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml e concentração de 50x10⁶ milhões de espermatozóides, submetidas a duas diferentes técnicas de congelamento.

O diluente FR-5[®] é composto por leite desnatado e gema de ovo. Ele contém glicerol como crioprotetor e não contém amidas em sua formulação. O diluente Botu-Crio[®] contém açúcares, aminoácidos, gema de ovo, glicerol e metilformamida.

Metade das amostras, diluídas em Botu-Crio[®] foram submetidas à curva de congelamento automatizada (A) e a outra metade, à curva de congelamento convencional, não-automatizada (B). Da mesma forma, as palhetas contendo as amostras diluídas com o FR-5[®] foram também congeladas com as duas curvas citadas.

Foram utilizadas duas curvas de congelamento, denominadas A e B. A curva de congelamento A foi realizada utilizando-se um sistema congelador automatizado programável, modelo Freeze Control[®] (CL-8800, Cryologic PTY. LTD; Austrália). A curva utilizada seguiu o protocolo descrito a seguir (SPRECKELS, 1994): início em 24° C, redução da temperatura até 5° C a 0,3° C/min. De 5° C a -15° C, redução de temperatura de 10° C/min. De -15° C até -100° C, redução de temperatura de -

25°C/min. A partir de -100°C, a temperatura foi reduzida em queda livre, com taxa de decréscimo de aproximadamente 30°C/min. A curva de congelamento B foi realizada conforme descrito por KNEIBL, S. (1993) em que as palhetas devem ser dispostas horizontalmente em vapor de nitrogênio líquido, em uma estante posicionada a 3 cm acima do nível do nitrogênio, por 20 minutos, e mergulhadas imediatamente no nitrogênio líquido. Neste sistema, a taxa média de congelamento do sêmen é de -70°C/minuto. Após o congelamento, as palhetas foram estocadas em botijão criogênico por pelo menos uma semana antes de serem descongeladas e avaliadas.

As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37° C por 30 segundos e posteriormente foram avaliadas quanto à motilidade total e progressiva, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, conforme descrito anteriormente para as amostras de sêmen fresco. Para a análise estatística dos resultados obtidos, foi realizada análise de variância considerando um delineamento inteiramente casualizado, em um modelo fatorial 2x2, com interação. Como co-variável foi considerado o valor do sêmen fresco da variável em estudo. Para comparação entre médias, foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Os dados foram analisados pelo programa Minitab - versão 14.1.

RESULTADOS

As amostras de sêmen fresco, sem diluição, apresentaram valor médio de motilidade progressiva de 14,2 % \pm 6,9 e valor médio de motilidade total de 70 % \pm 18,2. A porcentagem média de integridade de membrana foi 81,9 % \pm 8,9 e a funcionalidade de membrana apresentou valor médio de 71,5 % \pm 10,1. A motilidade total e a motilidade progressiva foram significativamente superiores ($P < 0,05$) nas amostras congeladas com o diluente Botu-Crio[®], nas curvas A e B, quando comparadas às amostras congeladas com o diluente FR-5[®]. Foi observada interação significativa entre diluente e curva de resfriamento, tanto para MP ($P < 0,01$) quanto para MT ($P < 0,01$) (Figura 1). As amostras diluídas em Botu-Crio[®] apresentaram índices significativamente superiores de células íntegras ($P < 0,05$), quando comparadas com os índices obtidos com o diluente FR-5[®] independentemente da curva de congelamento utilizada. A curva de congelamento A apresentou índices significativamente superiores ($P < 0,05$) de células íntegras, quando comparada aos índices obtidos com a curva B, independentemente do diluente utilizado. Não houve interação entre curva e diluente. (Figura 1). De forma semelhante, as amostras de sêmen equino criopreservadas com o diluente Botu-Crio[®]

foram as que possuíram as melhores taxas de preservação de funcionalidade de membrana plasmática após o descongelamento ($P < 0,05$) (Figura 1)

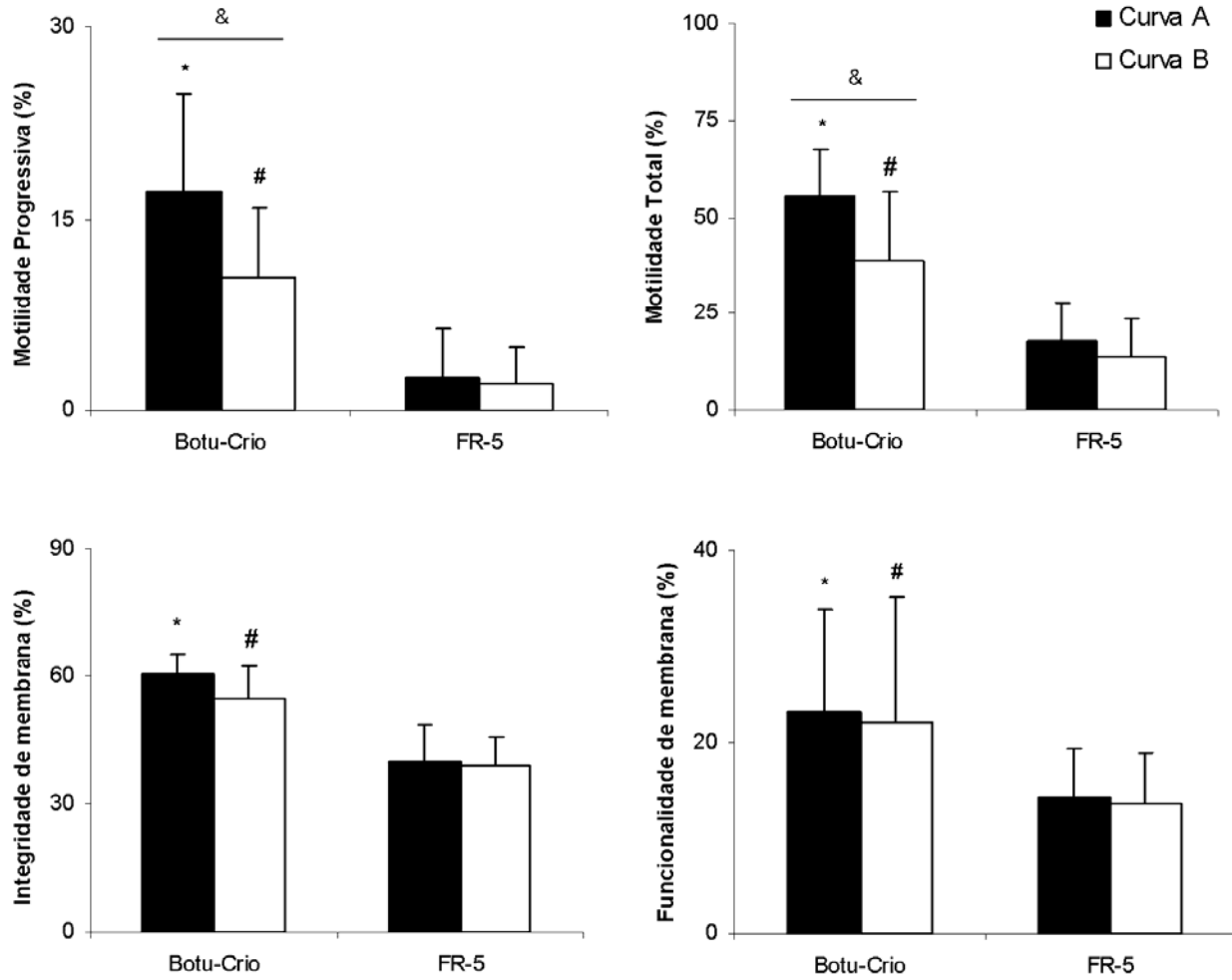


Figura 1 – Valores da média e desvio padrão da motilidade progressiva, motilidade total, integridade e funcionalidade da membrana espermática do sêmen criopreservado com curva automatizada (A) e curva não automatizada (B), e os diluentes Botucrio e FR-5. * e # significam diferença significativa entre os diluentes ($P < 0,05$); & significa diferença significativa entre as curvas de congelamento ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

A maior eficiência na criopreservação de espermatozóides eqüinos observada na curva de congelamento A, nas amostras congeladas com ambos os diluentes, deve-se provavelmente a uma maior precisão no controle do decréscimo de temperatura, pois o sistema de congelamento automatizado preservou de maneira mais eficiente a motilidade total e progressiva, a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozóides eqüinos. Dados semelhantes foram encontrados por COCHRAN et al. (1984) quando compararam a eficiência de um sistema de congelamento automatizado com um não-automatizado.

Os dados encontrados indicam que as amostras congeladas com diluente à base de amidas resultam na obtenção de uma melhor motilidade progressiva no sêmen, após o congelamento, do que quando se utiliza o diluente FR-5[®]. Além disso, os dados estão de acordo com outros autores que analisaram a eficiência dos crioprotetores sem a análise combinada de diluentes com curvas de congelamento (PAPA et al., 2002; ALVARENGA, 2003).

Os valores médios de motilidade total, verificados na avaliação do sêmen fresco, situam-se dentro dos padrões referidos pela literatura (McKINNON, VOSS, 1993). Os valores médios de motilidade progressiva foram inferiores aos definidos como normais. Entre as amostras analisadas, demonstrou-se que o maior índice de motilidade total ocorreu na interação entre a curva de congelamento A e o diluente Botu-Crio[®], indicando que esta combinação potencializou a eficiência de preservação dos espermatozóides eqüinos. Os valores encontrados são semelhantes aos relatados por BUSTAMANTE-FILHO (2006) e superiores aos observados por GOMES et al. (2002) e VIDAMENT et al. (1997). Paralelamente, os índices de motilidade total encontrados, quando foi utilizado o mesmo diluente combinado com a curva B, foram de 38,7 % \pm 17,8. Estes dados são semelhantes aos referidos por GOMES et al. (2002).

Além disso, a manutenção dos índices de motilidade progressiva em valores próximos aos do sêmen fresco estão de acordo com as observações de GOMES et al. (2002) e ALVARENGA et al. (2005). Esses autores relataram que diluentes contendo amidas em sua formulação produzem melhores resultados quanto à preservação de sêmen de eqüinos que não apresentam bons índices ao congelamento com diluentes contendo altas concentrações de glicerol.

Os valores médios da motilidade progressiva obtidos com o diluente FR-5[®] nas amostras de sêmen descongelado foram inferiores aos relatados na literatura (ALVARENGA et al., 2005; BUSTAMANTE-FILHO, 2006). Alguns autores consideram que, em algumas raças e animais, os efeitos deletérios do glicerol se tornam mais acentuados (GOMES et al., 2002).

Os animais utilizados neste experimento, segundo a classificação de BRINSKO et al. (2000), apresentam menos de 25% de motilidade progressiva, pós-descongelamento; portanto são classificados como animais com sêmen de baixa congelabilidade. Diversos autores têm demonstrado que a utilização de agentes à base de amidas como crioprotetores pode ser uma alternativa, principalmente para estes ganhões (MEDEIROS, 2003; PAPA et al., 2002). O efeito benéfico reportado, com a utilização de uma combinação entre a curva automatizada e um diluente à base de amidas, pode indicar que esta metodologia poderia vir a ser adotada em amostras de sêmen de animais de alto valor agregado e que apresentem sêmen considerado abaixo dos parâmetros de alta congelabilidade.

Os valores do teste hiposmótico para a funcionalidade de membrana evidenciaram maior eficiência na criopreservação de espermatozóides diluídos com Botu-Crio[®], quando comparados aos resultados das amostras criopreservadas com o diluente FR-5[®]. Estes dados demonstram que o diluente Botu-Crio[®] foi mais eficiente na preservação da funcionalidade da membrana, quando combinado com as duas curvas de congelamento, corroborando a tendência observada nos valores médios de motilidade progressiva e total.

A curva automatizada e o diluente Botu-Crio[®], separadamente, foram responsáveis pela melhor proteção das células contra os danos da criopreservação, o que foi constatado pelo menor número de células com membranas lesadas, quando comparados aos resultados encontrados com as amostras em que se utilizou a curva convencional de congelamento e o crioprotetor. A velocidade de redução da temperatura durante o congelamento é uma das etapas mais importantes no processo de criopreservação, uma vez que variações não-desejáveis na curva de resfriamento aumentam o grau de desafio enfrentado pelos espermatozóides. Este desafio abrange variações osmóticas, danos na membrana plasmática e lesões de organelas comprometendo acrossoma, mitocôndrias e DNA, peças-chave na função espermática (MOORE, 2006).

O presente trabalho está de acordo com os resultados obtidos por MEDEIROS (2003), que ressaltou uma maior eficiência dos diluentes contendo amidas, como a dimetil-formamida, em relação ao glicerol, na manutenção da integridade da membrana espermática. Segundo estes autores, a eficiência dos diluentes que contém amidas pode estar relacionada ao seu menor peso molecular, possibilitando maior penetrabilidade através das membranas plasmática e acrossomal, levando conseqüentemente a um menor dano osmótico.

CONCLUSÕES

Encontrou-se maior eficiência na criopreservação de sêmen eqüino com a utilização do diluente comercial Botu-Crio[®], combinado tanto com o sistema de congelamento automatizado quanto com o sistema de congelamento convencional. Foi possível demonstrar ainda que houve interação significativa entre o diluente Botu-Crio[®] e a curva automatizada, produzindo efeito potencializador. Os resultados encontrados sugerem que, de uma maneira geral, o sistema de congelamento automatizado causa menos danos aos espermatozoides, sendo indicada a adoção de diluentes contendo amidas como crioprotetor.

Apesar de ainda apresentar baixa eficiência, a criopreservação de sêmen eqüino faz-se necessária devido às exigências de mercado. O material criopreservado apresenta capacidade de armazenamento por longos períodos e viabiliza a criação de bancos de material genético de animais de destaque e/ou alto valor agregado.

AGRADECIMENTOS

À professora Vera Beatriz Wald, pela colaboração na análise estatística. Ao Professor Dr. Frederico Ozanam Papa (UNESP Botucatu), pela cessão do diluente Botu-Crio[®]. Agradecemos, também, ao apoio técnico de Márcia Rodrigues Trein e Cristina Botelho Messias.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M. A. **Melhoria da resistência espermática à congelamento e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões.** Botucatu, 2003. Tese (Livre docência)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

ALVARENGA, M.A., et al. Amides as cryoprotectant for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**. v. 89, p. 105-113, 2005.

BRINSKO, S. et al. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129-136, 2000.

BUSTAMANTE-FILHO, I.C. **Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen equino.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2006.

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

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. **The spermatozoon.** In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. The physiology of reproduction. cap.2, p. 29-77. New York: Raven Press. 1994.

GOMES, G.M. et al. **Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed.** **Theriogenology**, v. 58, p. 277-279, 2002.

HARKEMA, W.; BOYLE, M.S. Use of fluorescent stains to assess membrane integrity of equine spermatozoa. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION. **Proceedings**. Den Haag. P. 1424-1426.1992.

KENNEY, R.M. et al. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion.** Hastings-E.U.A., Society for Theriogenology, 1983

KNEIßL, S. **Tiefgefrierkonservierung Von Pferdesperma: Einfluß der Samenentnahmetechnik, zentrifugation, konfektionierungsform und Einfriermethode auf die motilität und membranintegrität der samenzellen.** 1993. Tese (Doutorado). Medicina Veterinária, Hannover, 1993.

LAGARES, M. A. et al. Efeito de diferentes diluentes sobre a membrana plasmática do espermatozóide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 153-156, 2000.

LOMEO, A. M.; GIAMBÉRSIO, A.M. Water-test: a simple method to assess sperm-membrane integrity. **International Journal of Andrology**. v. 14, n 4, p. 278-282, 1991.
McKINNON, A. O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, 3 ed. Filadelfia: Lea & Febiger, 1993, p.1322.

MEDEIROS, A.S. **Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozóides de garanhões**. 2003.Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

MOORE, A.I. et al. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 5, p. 215-218, 2006.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: 10TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION. **Proceedings** Urbana-Champaign, Estados Unidos,p 377-378, 1984

PAPA, F.O. et al. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 184-187, 2002.

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

SPRECKELS, I. **Untersuchungen zur samenzell- selektion mittels glaswollsephadex filtration bei hengstsperma unter besonderer berücksichtigung der kryokonservierung**.1994. Tese (Doutorado), Hannover, Deutschland, 1994.

VIDAMENT, M. et al. Equine frozen semen freezability and fertility fiel results. **Theriogenology**, v. 48, p. 907-17, 1997.

VIDAMENT M. et al. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science** v.61, p.201-218, 2001.

4 DISCUSSÃO GERAL

A eficiência das técnicas de criopreservação de sêmen eqüino é, atualmente, reduzida, quando comparada com os resultados de criopreservação de sêmen bovino ou humano, por exemplo. Aparentemente, os parâmetros definidos para proteger e preservar as células, ou espermatozóides parecem não ser os mesmos para os espermatozóides eqüinos, uma vez que, quando são adotadas as mesmas técnicas e procedimentos, que produzem resultados positivos para outras espécies, resultam em doses de sêmen com baixa viabilidade em eqüinos. Esta característica tem reduzido a aplicação da técnica de criopreservação de sêmen em eqüinos, devido a sua baixa eficiência. Neste sentido, no presente trabalho foram realizadas análises, a fim de definir um protocolo para criopreservação de sêmen eqüino, que conferisse melhores taxas de fertilidade às doses de sêmen pós-congelamento. Para tanto, foram definidos dois procedimentos para a indução de congelamento, um automatizado e outro não, combinados com dois crioprotetores comerciais, um comumente utilizado e outro novo no mercado.

A maior eficiência na criopreservação de espermatozóides eqüinos observada na curva de congelamento A, nas amostras congeladas com ambos os diluentes, deve-se provavelmente a uma maior precisão no controle do decréscimo de temperatura, existente no método automatizado, que as amostras foram submetidas e que melhor preservaram a motilidade das células. Moran (1992) e Graham (1996) referem que a região da curva de resfriamento na qual os espermatozóides eqüinos parecem ser mais sensíveis é entre 20° e 8°C. Além disso, como salientaram Cochran *et al.* (1984), o congelamento realizado de forma automatizada oferece a vantagem de possuir controle automatizado no decréscimo de temperatura, enquanto que no congelamento rápido, em caixa de isopor, a curva de congelamento pode ser apenas estimada e não programada e controlada de forma precisa.

No presente estudo, os valores médios de motilidade total verificados na avaliação do sêmen fresco situam-se dentro dos padrões referidos pela literatura (McKINNON; VOSS, 1993). Os valores médios de motilidade progressiva, entretanto, foram considerados inferiores, quando comparados com os definidos como normais.

Os valores de motilidade total para sêmen eqüino descongelado, citados na literatura, variam entre 15 e 75%. Estes dados se referem a diferentes raças, diluentes,

protocolos de refrigeração e congelamento (ANGOLA, 1992; HEITLAND, 1996; LOOMIS; CLARK, 1998; CROCKET *et al.*, 2001; BLANES, 2005).

Dentre as amostras analisadas, foi possível demonstrar que, o maior índice de motilidade total ($55,53\% \pm 12,01$) ocorreu na interação entre a curva de congelamento A e o diluente Botu-Crio®, indicando que a combinação desta curva com o referido diluente produziu uma ação sinérgica. Os valores encontrados são semelhantes aos relatados por Snoeck (2003), Baumber *et al.*, (2005), Bustamante (2006), Vidament (2002) e superiores aos observados por Gomes *et al.*,(2002), Mercante *et al.*, (1995) Vidament *et al.*, (1997).

Paralelamente, os índices de motilidade total encontrados, quando utilizou-se o mesmo diluente combinado com a curva B, foram de $38,75\% \pm 17,84$. Estes dados são semelhantes aos referidos por Gomes *et al.*, (2002), que observaram índice médio de 37% de motilidade total pós-descongelamento, utilizando diluentes a base de diferentes amidas. Assim, foi possível demonstrar que a combinação da curva de congelamento A com o diluente Botu-Crio® mostrou ser a melhor combinação como protocolo de criopreservação, no que tange a motilidade total.

Os baixos índices de motilidade total verificados nas amostras que foram congeladas com o diluente FR5 combinado com ambas as curvas encontram-se em concordância com dados publicados por vários autores (ALVARENGA *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2002; PAPA *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2003; NEVES NETO, 2004), que observaram motilidade progressiva superior em amostras congeladas com diluentes à base de amidas, em razão de sua baixa toxicidade. Vale ressaltar que os autores mencionados compararam a eficiência da utilização de diferentes diluentes sobre a motilidade progressiva; porém, não realizando estudo de combinação destes com diferentes curvas de congelamento.

Entretanto, os valores médios de motilidade total são inferiores aos referidos por Bustamante (2006), que utilizou o mesmo diluente e curva convencional de criopreservação e obteve valores de motilidade total de aproximadamente 25%, no congelamento de sêmen de garanhões da raça crioula. De acordo com Alvarenga (2003), a raça do garanhão pode interferir nos resultados da congelabilidade do sêmen, o que, em parte, poderia explicar essa discordância entre os valores descritos por diferentes grupos.

A mesma tendência observada na motilidade total foi verificada para os valores de motilidade progressiva. Quando a motilidade progressiva foi analisada, a interação

observada entre o diluente Botu-Crio® e a curva de congelamento A ($17,25 \pm 7,52$) indica que esta combinação foi a melhor na preservação desta característica espermática. Além disso, o índice é semelhante ao que foi observado no sêmen fresco, evidenciando que não ocorreu efeito negativo durante ou após o processo de congelamento. A manutenção dos índices de motilidade progressiva em valores próximos aos do sêmen fresco estão de acordo com as observações de Gomes *et al.* (2002), Alvarenga, (2003) e Alvarenga *et al.*, (2005), que relataram que diluente a base de amidas produz melhores resultados na preservação de sêmen de reprodutores eqüinos, que não apresentam bons índices ao congelamento com diluentes contendo altas concentrações de glicerol, que, neste caso, seriam Botu-Crio® e FR-5® respectivamente.

Valores médios, semelhantes aos demonstrados neste trabalho, para motilidade progressiva ($17,25 \pm 7,52$) foram referidos por Medeiros *et al.* (2002) em amostras congeladas com diferentes concentrações de amidas e/ou glicerol. Alvarenga *et al.* (2005) obtiveram índices de motilidade progressiva de 13 a 5%, utilizando diluentes com diferentes concentrações de amidas e/ou glicerol, em garanhões Mangalarga, que apresentaram um histórico de resultados insatisfatórios ao congelamento com glicerol.

Os valores médios da motilidade progressiva obtidos com o diluente FR-5® nas amostras de sêmen descongelado, foram inferiores aos relatados na literatura (SNOECK, 2003; VIDAMENT, 2002; HENRY, 2002; MEDEIROS *et al.* 2002; ALVARENGA *et al.* 2005; BUSTAMANTE, 2006). Inúmeros autores consideram que, em algumas raças e animais, os efeitos deletérios do glicerol se tornam mais acentuados (COMBES, 2000; SNOECK, 2003, GOMES, 2002; ALVARENGA, 2003; ALVARENGA, 2005), o que pode ter ocorrido no presente trabalho. Além disso, os valores médios da motilidade progressiva, observados no sêmen fresco, considerados como abaixo da média, podem ter contribuído pra os baixos índices verificados nas amostras pós-congelamento.

A dimetilformamida e a metilformamida são crioprotetores que vem sendo utilizados com grande sucesso no congelamento de sêmen eqüino. Porém, seu uso para congelamento de sêmen de garanhões com boa congelabilidade não proporciona aumento da motilidade e sim resultados semelhantes ao do glicerol quanto à motilidade do sêmen (KEITH, 1998). No entanto, a utilização desses agentes em garanhões com baixa resistência ao processo de criopreservação, produziu melhores resultados quando comparados com o glicerol (GOMES *et al.* 2002).

Os ganhões utilizados neste experimento, segundo a classificação de Brinko *et al.* (2000), que apresentam menos de 25% de motilidade progressiva, pós-descongelamento, são classificados como animais com sêmen de baixa congelabilidade. Diversos autores têm demonstrado que a utilização de agentes à base de amidas como crioprotetores pode ser uma alternativa, principalmente para ganhões de principalmente para ganhões de baixa congelabilidade (ALVARENGA *et al.*, 2000; KEITH *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2002; PAPA *et al.*, 2002). O efeito benéfico reportado neste trabalho, com a utilização de uma combinação entre curva programada em congelador automatizado e um diluente à base de amidas, para os parâmetros de motilidade que os ganhões utilizados apresentaram, pode indicar que, apesar de mais dispendiosa, essa metodologia poderia vir a ser adotada em animais de alto valor agregado e que apresentem sêmen considerado abaixo dos parâmetros de alta congelabilidade.

Os resultados descritos no presente trabalho, de motilidade total e progressiva favoráveis ao diluente Botu-Crio[®] indicam uma melhor proteção dos espermatozoides do que o diluente com alta concentração de glicerol, FR-5[®]. Os resultados indicam ainda que a combinação entre o diluente Botu-Crio[®] e curva automatizada foi o melhor protocolo, dentre os testados neste trabalho, para preservar o sêmen equino. Trabalhos anteriormente publicados por diversos autores, em diferentes espécies animais, onde se utilizou crioprotetores ricos em amidas em comparação com o glicerol demonstraram uma superioridade na criopreservação de sêmen com diluentes ricos em amidas (HANADA; NAGASE, 1980; LAKE; RAVIE, 1984; TSELUTIN *et al.*, 1995, CHALAH *et al.*, 1999). Vários grupos (ALVARENGA *et al.*, 2000; KEITH *et al.*, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2002; Papa *et al.*, 2002), indicando que estes podem ser crioprotetores alternativos, principalmente para ganhões cujo sêmen apresente baixa congelabilidade em diluentes ricos em glicerol.

Os resultados encontrados, quando o teste hiposmótico foi aplicado às amostras, evidenciaram maior eficiência na criopreservação de espermatozoides que haviam sido diluídos com Botu-Crio[®] (22,63%±11,87), quando comparados aos resultados das amostras criopreservadas com o diluente FR-5[®] (13,88%±5,14). Estes dados demonstram que o diluente Botu-Crio[®] foi mais efetivo na preservação da funcionalidade da membrana, quando combinado com as duas curvas de congelamento.

A ausência de variação entre as curvas de congelamento indica que a composição do diluente utilizado interfere de forma mais determinante na funcionalidade da membrana do que o tipo de congelamento utilizado, visto que os métodos de congelamento que não interferiram significativamente nos resultados. Esses resultados corroboram a tendência observada nos valores médios de motilidade progressiva e total, favoráveis ao diluente Botu-Crio[®]. Diferentes protocolos para o teste hiposmótico e suas interpretações têm sido utilizados, tornando difícil a comparação dos resultados obtidos. Este fato pode explicar a grande variabilidade encontrada na resposta de motilidade *versus* a porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico, descrito por diferentes autores, conforme referido por Snoeck, (2003). De acordo com Neild *et al.*, (2000), embora não exista uma correlação entre a taxa de prenhez e os resultados obtidos com o teste hiposmótico, este mostrou uma tendência de correlação com o número de serviços por prenhez. Vários autores salientam ainda que o teste hiposmótico deva ser utilizado em conjunto as avaliações de rotina da qualidade de sêmen (NEILD *et al.*, 2000; NEILD *et al.*, 2000).

Os valores médios do teste hiposmótico obtidos foram superiores aos observados na motilidade progressiva, o que está de acordo com os resultados descritos na literatura (NEILD *et al.*, 1999; NEILD *et al.*, 2000; LAGARES *et al.*, 2001). Entretanto, outros grupos (PAPA *et al.*, 2001; DELL'AQUA Júnior *et al.* 2002; SNOECK, 2003) relataram que os valores para integridade funcional da membrana foram inferiores aos valores observados para motilidade total e progressiva. Ainda, outros autores consideram que não há diferenças entre os valores médios destes parâmetros (BUSTAMANTE, 2006).

Ainda, a integridade da membrana plasmática é um requisito essencial para que os espermatozóides sejam considerados aptos a fecundar um oócito (HARRISON; VICKERS, 1990). No presente estudo, foi observada maior eficiência ($p < 0,05$) no congelamento do sêmen em curva automatizada, com uma média de 50,10% de espermatozóides com membranas íntegras contra 46,83%, observados na curva convencional. Vale ressaltar que, diferentemente dos resultados encontrados para a variável motilidade, não houve interação entre diluente e curva de congelamento. Neste sentido, ainda observamos que os resultados relatados no momento mostraram-se superiores aos encontrados por Bustamante (2006), Snoeck (2003), com sêmen equino e Valcárcel *et al.*, (1994) em trabalhos realizados com sêmen ovino. Ademais os

resultados encontrados por nosso grupo discordam da tendência relatada pelos autores mencionados, que observaram grande redução na integridade de membranas pós-descongelamento, embora os índices de motilidade permaneçam elevados.

Segundo Taresson *et al.*, (1977), os processos de congelamento e descongelamento afetam de 40 a 50% das células. Podemos observar que os valores apresentados no presente trabalho são semelhantes ao citado por Taresson *et al.*, (1977), onde os melhores resultados encontrados na manutenção da integridade das membranas espermáticas foram o congelamento com o diluente Botu-Crio[®], com média de 57,53% de espermatozóides com membrana íntegra pós-descongelamento, significativamente superior ($p < 0,05$) a 39,40%, verificada nas amostras congeladas com o diluente FR-5[®].

A curva automatizada e o diluente Botu-Crio[®], separadamente, foram responsáveis pela melhor proteção das células contra os danos da criopreservação, o que foi constatado pelo menor número de células com membranas lesadas, quando comparados aos resultados encontrados com as amostras onde utilizou-se a curva convencional de congelamento e o crioprotetor FR-5[®].

A diferença observada entre as duas curvas de congelamento indica que a curva automatizada foi mais efetiva, proporcionando menor índice de lesões e preservando a integridade da membrana. Esta tendência não foi observada no teste hiposmótico, no qual as diferentes curvas testadas produziram resultados similares. Estes resultados sugerem que a integridade estrutural da membrana foi mais afetada pelas variações da curva de congelamento.

Os resultados apresentados no momento, de amostras de sêmen equino congelado com diluente rico em amidas não condizem com os relatados por González (2002), que, criopreservando sêmen bovino em curvas de congelamento convencional e automatizada constatou respectivamente apenas 4,65% e 5,17% de espermatozóides com membranas íntegras após descongelamento.

Em concordância com nossos resultados, Medeiros *et al.*, (2003) e Keith (1998), ressaltaram uma maior eficiência dos diluentes ricos em amidas, como a dimetilformamida, em relação ao glicerol, na manutenção da integridade da membrana espermática. Segundo estes autores, a eficiência dos diluentes ricos em amidas pode estar relacionada ao seu menor peso molecular, que lhes confere maior penetrabilidade através das membranas plasmática e acrossomal. Os diluentes que utilizam amidas têm sido utilizados com sucesso no congelamento de sêmen de outras espécies tais como: gansos (LUKASZEWICZ, 2002), coelhos (HAMADA; NAGASE, 1980).

Desta forma, podemos concluir que, quando a motilidade progressiva e motilidade total foram analisadas, encontramos maior eficiência na criopreservação de sêmen eqüino quando utilizamos o diluente comercial, Botu-Crio[®], rico em amidas, combinado tanto com o sistema de congelamento automatizado quanto com o sistema de congelamento convencional. Foi possível demonstrar ainda que houve interação significativa entre o diluente Botu-Crio[®] e a curva automatizada produzindo efeito sinérgico.

Entretanto, quando foram analisadas a funcionalidade e a integridade das membranas dos espermatozóides eqüinos submetidos aos diferentes sistemas combinados de criopreservação, demonstramos que não houve interação entre a combinação dos diferentes sistemas de congelamento com os diferentes diluentes.

Isoladamente, quando o diluente Botu-Crio[®] foi utilizado, este promoveu maior proteção de membranas espermáticas, enquanto que não houve diferenças, sobre a funcionalidade de membrana, quando as amostras de sêmen eqüino foram congeladas pelo método automatizado ou não. Mas, quando a integridade das membranas dos espermatozóides foi avaliada, estas se encontravam mais preservadas, quando as amostras haviam sido congeladas pelo método automatizado. Conseqüentemente, os resultados encontrados sugerem que, de uma maneira geral, o sistema de congelamento automatizado causa menos danos aos espermatozóides. E, quando possível, devido ao custo mais elevado (aproximadamente 4x), é indicada a adoção de diluentes ricos em amidas, como o Botu-Crio[®].

Apesar de ainda apresentar baixa eficiência a criopreservação de sêmen eqüino faz-se necessária devido às exigências de mercado. O material criopreservado apresenta grande durabilidade e viabiliza a criação de bancos de material genético de animais de destaque e/ou alto valor agregado.

Mais estudos devem ser realizados a fim de incrementar as técnicas de criopreservação e aumentar sua eficiência, com o intuito de aumentar a longevidade das amostras e minimizar perdas durante o processo de criopreservação disponibilizando material de maior qualidade ao mercado.

5 REFERÊNCIAS

AGCA, Y.; CRITSER, J.K. Cryopreservation of spermatozoa in assisted reproduction. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, n. 21, p. 15-23, 2002.

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. **Theriogenology**, v. 57, p. 1801-1808, 2002.

ALMQUIST, J.O.; WIGGINS, H.B. Survival of Bull spermatozoa frozen and thawed by different methods in plastic straws. **A I Digest**, v. 21, n. 7, p. 12, 1973.

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 systems. **Equine Vet. J.**, v. 32(6), p. 541-545, 2000a.

ALVARENGA, M.A.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, E.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. **Proc. Int. Congr. Anim Reprod.**, p. 157, 2000b. (abstract).

ALVARENGA, M.A.; LEÃO, K.M.; PAPA, F.O. Improvement of stallion semen post-thaw motility with the utilization of dimethyl-formamide as cryoprotector. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 459, 2002.

ALVARENGA, M.A. **Melhoria da resistência espermática a congelamento e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões.** Botucatu, 2003. Tese (Livre docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2003.

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

AMANN, R.P. & GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. p. 715-745

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-73, 1987.

ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH, A.S.; CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipides during freezing. **Cryobiology**, v. 24, p. 324-331, 1987.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos dos diluentes e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso da microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análise computadorizada da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo, 2000, Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, 2000.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31(suplemento). Porto Alegre: UFRGS, p. 226-227, 2003.

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

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, IA: Iowa State University, 1989. 258p.

BAUDOT, A.; CAULA, C.; DUARTE, M.L.; FAUSTO, R Thermal study of simple aminoalcohol solution, **Cryobiology**, v. 44, p. 150-160, 2002.

BAULNY, B.O.; LABBE, C.; MAISSE, G. Membrane integrity mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 39, p. 177-184, 1999.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **Am. J. Vet. Res.** v. 66, p. 772-779, 2005.

BEDFORD, S.J.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, p. 955-967, 1995.

BIELANSKI, W.; KACZMARSKI, F. Morphology of spermatozoa in semen from satallion of normal fertility. **Journal or Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 27, p. 39-45, 1979.

BILGILI, S.F.; RENDEN, J.A. Fluorimetric determination of avian sperm viability and concentration. **Poultry Science**, v. 63, n. 11, p. 2275-77, 1984.

BLANCO, J.M.; GEE, G.; WILDT, D.E.; DONOGHUE, A.M. Species variation in osmotic cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1167-1171, 2000.

BLANES, M.S.; PAPA, F.O.; DORES, C.B.; MELO, C.M.; CROCCI, A.J. Influência do número de espermatozoides e tempo de estabilização na congelamento de sêmen eqüino utilizando-se diluente Botu-Crio. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 3, p. 303, 2005.

BUSTAMANTE-FILHO, I.C. **Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen eqüino**.Dissertação (Mestrado em Zootecnia-Produção Animal). Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2006.

CASEY,P.J., HILLMAN,R.B.,ROBERTSON,K.R., YUDIN, A.I., LIU, I.K.M., DROBINS,E.Z. Validation of an acrossomal stain for equine sperm that differentiates betwenn living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v. 14,.n. 4, p. 289-297, 1993.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2005.

CHALAH, T.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E.; BRILLARD, J.P. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. **Cryobiology**, v. 39, n. 2, p. 185-191,1999.

CHAN, S.Y.; WANG, C.;SO, W.W.; HO,P.C. Multivariate discriminant analysis of the relationship between the hypo-osmotic swelling tetst and the *in vitro* fertilizing capacity of human sperm. **Journal of Andrology** , v. 11(5), p. 369-378, 1988.

COCHRAN, J.D., AMANN, R.P., FROMAN, D.P., PICKETT, B.W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the

post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology**, v. 22, p. 25-38, 1984.

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

CROCKETT, E. T.; 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, p. 793-803, 2001.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; AURELLWISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochem. J.**, v. 242, p. 1-10, 1987.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, p. 831-841, 1997.

DELL AQUA JÚNIOR, J.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S. *et al.* Novo teste hiposmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. Revista **Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 189-191, 2002.

De LEEUW, A.M., DEN DAAS, J.H., WOELDERS, H. The fix vital stain method: Simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 12, p. 112-118, 1991.

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

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

EDDY, E.M.; The spermatozoon . In: KNOBILL, E. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1988, p. 27-68

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. cap.2, p. 29-77. New York: Raven Press. 1994.

EINARSSON, S. Concluding Remarks. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 88, p. 165-166, 1992.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**, v. 3, p. 1-13, 1996.

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

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

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochem. Biophys. Acta** v. 1469, p. 197-235, 2000.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M.; STOUT, T.A.E; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrossome reaction in equine sperm. **Animal reproduction Science**, v. 68, p. 249-265, 2001.

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

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, p. 277-279, 2002.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet. Clin. North. Am.: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.

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

HANADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effect of some amides on rabbit spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 247-252, 1980.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.;NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-28, 1992.

HARKEMA, W.; BOYLE, M.S. Use of fluorescent stains to assess membrane integrity of equine spermatozoa. In: INTERNACIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION,12., 1992. **Proceedings**. Den Haag. P. 1424-1426.1992.

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

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K.; PICKETT, B.W.; HAMILTON, C. Factors effecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, p. 47-53, 1996.

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

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

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

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. In: CONGRESSO DE MEDICINA EQUINA, 1, Jaboticabal, SP,1994. **Proceedings**. Jaboticabal, 1994, p.156-165.

JOHNSON, L.A., MAXUEL, W.M.C., BRISKY, J.R. Staining sperm or viability assessment. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n. 1, p. 37-45, 1996.

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

KELLER, A. **Efeito de dois Métodos de Remoção do Plasma Seminal, de três Diluentes e do Tempo de Armazenamento sobre algumas Características Espermáticas dos Equino.** 1998. Dissertação. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 1998.

KENNEY, R.M.; HURTTGEN, J.; PIERSON, R.; WHITERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion.** Hastings-E.U.A., Society for Theriogenology, 1983.

KOTYAGINA, V.; PLATOV, E.; ROMBE, S. The fertility of stallion semen preserved at a temperature of -78°C. **Anim Breed Abstr**, v. 31, p. 458, 1963.

KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUMDER, G.C. Effect of amino acid on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using chemically defined model system. **Cryobiology**, v. 41, p. 21-27, 2001.

LAGARES, M.A.; MEIRELLES, L.S.; WALD, V.B.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Efeito de diferentes diluentes sobre a membrana plasmática do espermatozóide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 153-156, 2000.

LAGARES, M.A.; AMARAL, D.C.G.; SOUZA, P.C. Efeito de diluentes e curvas de resfriamento sobre a motilidade e integridade da membrana plasmática do espermatozóide equino criopreservado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14, 2001, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte : CBRA, 2001, p. 452-453.

LAKE, P.E.; RAVIE, O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. **British Poultry Science**, v. 25, n. 1, p. 145-150, 1984.

LANDA, C.A.; ALMQUIST, J.O.; Effect of freezing large numbers of straws of bovine spermatozoa in an automatic freezer on post-thaw motility and acrossomal retention. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 5, p. 1190-1194, 1979.

LOOMIS, R.P.; CLARCK, J.S. Motion characteristics of frozen-thawed equine spermatozoa packed in 0.5 mL straws at various concentrations. **Society for Theriogenology Proceedings for annual Meeting**, Baltimore, p. 84-85. 1998.

LUKASZEWICZ, E. An effective method for freezing White Italian Garder semen. **Theriogenology**, v. 58, p. 19-27, 2002.

MCKINNON, A. O.; VOSS, J.L.: **Equine Reproduction**, 3 ed. Filadelfia: Lea & Febiger, 1992, p.1322

MARSHBURN, P.B.; Mc INTIRE, D.; CARR, B.R.;BYRD, W. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. **Fertility and Sterility**, v. 58, p. 179-186, 1992.

MATTOS, R. **Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen eqüino sobre a fertlidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana.**1995. Dissertação. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 1995.

MAXWEEL, W.M.C.; WELCH,G.R.; JOHNSON,L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction Fertillity and Development.** v. 8, p. 1165-1178, 1997.

McCALL, J.P.; SORENSEN, A.M. Evaporated milk as an extender for stallion semen. **AI Digest**, v. 12, p. 8-10, 1971.

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

MEDEIROS, A.S. **Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozóides de garanhões.** 2003.Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

MORAN, D.M. **Effects of cooling rate and storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa.** Fort Collins. 1992. Dissertação (Mestrado) .Colorado State University.1992.

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; BRUEMMER,J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n. 5, p. 215-218, 2006.

MORTIMER, S.T.; SCHEVAERT, D.; SWAN, M.A.; MORTIMER,D. Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 12, p. 1006-1012, 1997.

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

NAGASE, H.; YAMASHITA, S.; TRIE, S. Protective effects of sugar against freezing injury of bull spermatozoa. **Proceeding 6th Int. Cong. Anim. Reprod. and AI**, v. 2, p. 1111-1113, 1968.

NAGASE, H. Studies on the freezing of stallion semen. I.Fertility results with stallion semen frozen in concentrated pellets form. II.Factors affecting survival rates of stallion spermatozoa after freezing and thawing and results of a fertility trial. **Anim. Breed. Abstr.**, v. 35, p. 195, 1967.

NEVES NETO, J.R. **Avaliação morfo-funcional e fertilidade de sêmen congelado equino utilizando diferentes diluentes e substâncias crioprotetoras.**2004. 102 f. Tese (Mestrado).Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, Brasil, 2004.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 721-727, 1999.

NEILD, D.M.; CHAVES, M.G.; FLORES, M.; MIRAGAYA, M.H.; GONZALEZ, E.; AGUERO, A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia**, v. 32, n. 6, p. 351-355, 2000.

NIE, G.J., WENSEL, J.G.W. Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1005-1018, 2001.

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

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA Jr, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 26, n. 3, p. 184-187, 2002.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; SOUZA, D.B. Effect of extender osmolarity and cooling to 5°C on motility and membrane integrity of equine frozen spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 343-344, 2001.

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

PICKETT, B. W. Seminal extenders and cooled semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Filadélfia: Léa & Febiger, 1993, p. 746-754.

PICKETT, B.W.; VOSS, J.L. Reproductive management of the stallion. **Proceedings Eighteenth Annual Convention A.A.E.P.**, p. 501-531, 1972.

ROMBE, S.; KOTJAGINA, V.; PILER, N. An Improvement method of preserving semen at - 79°C. **Anim Breed Abstr**, v. 33, p. 363, 1965.

ROSSI, T.C.; PAPA, F.O.; SANTOS, T.B. *et al.* Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 350-352, 2003.

SAMPER, J.C., MORRIS, C.A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**, 1998.

SILVA, A.F.; COSTA E.P.; OLIVEIRA F.A.; TORRES C.A.A; HASS, G.T.S, NASCIMENTO, V.A.; Uso de dimetil-formamida associada ou não ao glicerol na criopreservação de sêmen caprino, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 452-456, 2006.

SNOECK, P.P.N. **Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade**. 2003. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, p.116.2003.

SPRECKELS, I. **Untersuchungen zur samenzell- selektion mittels glaswollsephadex filtration bei hengstsperma unter besonderer berücksichtigung der kryokonservierung**. 1994. Tese (Doutorado), Hannover, Deutschland, 1994.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Principles of cryopreservation. In: **Cooled and frozen Stallion Semen**, b.09, 1999.

TARESSON, F.; AMIS, D.; SCHINDLER, H. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 461-462, 1977.

TRIMECHE, A.; YVON, J.M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E. MAGISTRINI, M. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenolog** v. 52, p. 181-191, 1990.

TSELUTIN, K.; NARUBINA, L.; MAVRODINA, T.; TUR, B. Cryopreservation of poultry semen. **British Poultry Science**, v. 36, n. 5, p. 805-811, 1995

VALCÁRCEL, A.; DE LASH ERAS, M.A.; PEREZ, L. Fluorescent stain as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 41, p. 439-455, 1994.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, P.J.; MEYERS, S.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. **Theriogenology**, v. 32, n. 4, p. 515-525, 1989.

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

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. 8, p. 1-3, 2002 (abstract).

WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. In: FINN CA, ed. **Oxford reviews of Reproduction Biology**. New York: Oxford University, 1979, v. 1, p. 283-330.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in 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 Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WILHELM, K.M.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Effects of phosphatidylserine and

cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 33, p. 320-329, 1996.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Celular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438-450, 2001.

YILDIZ, 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. 579-585, 2000.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998, 121 f. Tese. Doutorado em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil. 1998.

ZOU, C.X.; YANG, Z.M. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. **Theriogenology**, v. 53, p. 1477-1488, 2000.

