



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

MARCELA LEITE CANDEIAS

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

NITERÓI
2010

MARCELA LEITE CANDEIAS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

NITERÓI

2010

C216

Candeias, Marcela Leite

Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador / Marcela Leite Candeias; orientador Felipe Zandonadi Brandão. – 2010. 105f.

Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal)–Universidade Federal Fluminense, 2010.

Orientador: Felipe Zandonadi Brandão

1. Criopreservação. 2. Mangalarga Marchador (Cavalo). 3. Sêmen. I. Título.

CDD 591.16

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Concentração: Clínica e Reprodução Animal.

Aprovada em 17 de maio de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão – Orientador
Faculdade de Veterinária – UFF

Prof. Dr. Júlio César Ferraz Jacob
Faculdade de Veterinária – UFRRJ

Prof. Dr. José Antônio da Silva Ribas
Instituto Biomédico – UFF

Prof. Dr. André Luís Rios Rodrigues
Faculdade de Veterinária – UFF

“ Já perdoei erros quase imperdoáveis, tentei substituir pessoas insubstituíveis e esquecer pessoas inesquecíveis. Já fiz coisas por impulso, já me decepcionei com pessoas quando nunca pensei me decepcionar, mas também decepcionei alguém. Já abracei para proteger, já dei risada quando não podia , já fiz amigos eternos, já amei e fui amado, mas também já fui rejeitado. Já fui amado e não soube amar. Já gritei e pulei de felicidade, já vivi de amor e fiz juras eternas, mas quebrei a cara muitas vezes!! Já chorei ouvindo música e vendo fotos, já liguei só para escutar uma voz, já me apaixonei por um sorriso, já pensei que fosse morrer de tanta saudade e... tive medo de perder alguém especial (e acabei perdendo), mas sobrevivi!

Não passo pela vida...e você também não deveria passar. VIVA!! Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão , perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”

CHARLES CHAPLIN

*Dedico aos meus pais Leonardo e Márcia (in memoriam)
por sempre me apoiarem em todos os momentos
difíceis da minha vida com seu amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre presente em minha vida, iluminando meus caminhos, me guiando com muito amor e sabedoria e me tornando uma pessoa cada dia mais forte e apta a superar os obstáculos que a vida tem.

Ao meu orientador, amigo e conselheiro Dr. Felipe Zandonadi Brandão, mas do que um excelente orientador, mas um exemplo de profissional, demonstrando sempre muita competência, dedicação, disciplina e caráter, não me deixando nunca desistir. Fica aqui meu sincero agradecimento com muito amor e gratidão por todo seu empenho comigo durante esta longa trajetória.

Ao Prof. Dr Marco Antonio Alvarenga, pela co-orientação e pelos ensinamentos e inspiração na área da Reprodução Equina.

Ao meu grande amigo e mestre Marco Antônio Maia, *in memorian*, o qual me transmitiu todos os ensinamentos da medicina veterinária equina. Fica meu eterno agradecimento e reconhecimento.

À minha grande companheira canina Sharon (*in memorian*) por estar sempre ao meu lado me fazendo rir e me sentir especial.

Ao Prof. Dr. Rodolpho de Almeida Torres Filho por estar sempre pronto a nos ajudar na elaboração da estatística, sempre com seu bom humor contagiante.

Ao Prof. Frederico Ozanan Papa por transmitir seus conhecimentos de forma empolgante e ajuda nas avaliações pós-descongelamento.

Aos meus amigos e veterinários Dr. Marcio Teoro do Carmo e Heder Nunes Ferreira por sempre se mostrarem solidários e atenciosos em todos os momentos que precisei e por me transmitirem seus conhecimentos de maneira incessante, estando sempre prontos a ajudar não poupando esforços.

OBRIGADA!

À minha “GRANDE” amiga e estagiária Mônica Souto Maior, pela mais que ajuda durante esta fase, se tornando meu braço direito, sempre

compartilhando alegrias e tristezas, e sem a qual nada teria se concretizado. Com certeza estará sempre presente em minha história. Muito Obrigada!

À minha amiga e veterinária Marcelle Cabral da Motta, pela paciência e ajuda dispensada durante todo o período do experimento sempre ajudando de forma paciente e amiga.

À minha querida e amada Família por caminharem passo a passo comigo, me dando forças para superar os obstáculos e vibrando com cada conquista minha, fazendo com que me sentisse sempre amada e amparada. AMO VOCÊS!

Às estagiárias Ana Christina Sued, Fernanda Torres e Daniela Ferreira pela ajuda na execução do experimento.

Aos funcionários dos Haras, Luís (Brow), Mineirinho, Elias e Andrezinho, pelo convívio alegre e por estarem sempre solícitos a ajudar com os animais para a realização do experimento.

Aos proprietários dos Haras Asa Guaratiba, Santorini e Golden Horse por gentilmente cederem seus garanhões e me proporcionarem a oportunidade de estudo e trabalho na medicina veterinária.

À Universidade Federal Fluminense por me receber de braços abertos.

Ao departamento de Reprodução e Radiologia Animal da UNESP – Botucatu por cederem suas instalações e laboratórios para as análises do sêmen pós-descongelamento.

À Capes pela concessão da bolsa de estudos para auxílio na execução deste experimento.

Expresso meus sinceros agradecimentos a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na realização deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização de três diluidores comerciais (Inra 82 e Merck Gema contendo 4% de glicerol e Botu-crio[®]), e dois tipos de envase (palhetas de 0,25 e 0,50ml) em diferentes protocolos de criopreservação, sobre alguns parâmetros seminais pós descongelamento. Dois ejaculados de doze garanhões foram colhidos através de uma vagina artificial, diluído (1:1) em meio à base de leite (Botu-sêmen[®]), em seguida centrifugados (600 x g /10 min) e ressuspensos com os respectivos meios de congelamento e divididos em seis tratamentos: $G_{INRA+0,25}$, $G_{INRA+0,50}$, $G_{BOTUCRIO+0,25}$, $G_{BOTUCRIO+0,50}$, $G_{MERCK+0,25}$ e $G_{MERCK+0,50}$. As palhetas do $G_{INRA+0,25}$ e $G_{INRA+0,50}$ foram submetidas a um resfriamento por 5° C por 60 minutos, para o $G_{BOTUCRIO+0,25}$, $G_{BOTUCRIO+0,50}$ por 20 minutos e o $G_{MERCK+0,25}$ e $G_{MERCK+0,50}$ não sofreram resfriamento e foram submetidos diretamente ao vapor de nitrogênio por 20 minutos, assim como os demais grupos e então imersos em nitrogênio líquido. Os parâmetros espermáticos foram avaliados através de análise computadorizada e a integridade de membrana plasmática através de microscopia de epifluorescência. Não foi observada interação entre os diluidores com os tipos de envase estudados, logo estes foram avaliados separadamente. Em comparações feitas entre os diluidores, observou-se que o diluidor Botu-crio[®] preservou melhor os parâmetros de motilidade espermática total e progressiva do que os diluidores Merck Gema e Inra82 (41,39%;19,37% vs 15,44%;6,57% vs 9,04%;3,06%, respectivamente – $P<0,05$). Para os parâmetros de VAP, VSL e VCL ($\mu\text{m/s}$), o diluidor Botu-crio[®] se mostrou superior ($P<0,05$) em relação ao Merck Gema e ao Inra82 (78,87; 66,64;150,68 vs 67,17; 60,00; 109,41 vs 63,8; 50,31; 121,12), porém, nos parâmetros de VAP e VCL, o Merck Gema e o Inra82 se equiparam ($P>0,05$). O Botu-crio[®] obteve melhores resultados no percentual de espermatozoides rápidos e médios (25,60; 15,81 vs 7,82; 7,48 vs 4,61; 4,27- $P<0,05$). Já em relação aos espermatozoides lentos e estáticos, Merck Gema e Inra82 apresentaram maiores resultados (17,04; 67,59 vs 17,04; 65,51) sem diferir entre eles ($P>0,05$). Não se observou diferença entre os diluidores no percentual de espermatozoides íntegros para Botu-crio[®], Merck Gema e Inra 82 (33,29 vs 33,68 vs 34,10). Em relação aos métodos de envase estudados, não houve diferenças entre estes. Através dos resultados do presente trabalho, pode-se concluir que as amostras de sêmen criopreservadas com o diluidor Botu-crio[®] proporcionaram melhores resultados nas avaliações pós-descongelamento quando comparados aos demais. Pôde-se observar também através destes resultados, que não ocorreram diferenças na viabilidade espermática pós-descongelamento utilizando palhetas de 0,25 e 0,50 ml.

Palavras chave: garanhão, sêmen, criopreservação, diluidor.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of three commercial extenders (Inra 82 and Merck Gema containing 4% glycerol and Botu-cryo®), and two types of filling (straws of 0.25 and 0.50 mL) in different cryopreservation protocols, on some semen parameters after thawing (MT, MP, VSL, VCL, VAP, % of intact sperm, fast, medium, slow and static). Two ejaculates of twelve stallions were collected by an artificial vagina, diluted (1:1) with milk extender (Botu-semen®), centrifuged (600xg/ 10 min) ,and resuspended with their extenders for freezing and divided into six treatments: $G_{INRA+0,25}$, $G_{INRA+ 0,50}$, $G_{BOTUCRIO + 0,25}$, $G_{BOTUCRIO + 0,50}$, $G_{MERCK + 0,25}$ and $G_{MERCK + 0,50}$. The straws of $G_{INRA+0,25}$, $G_{INRA+ 0,50}$, were submitted to a cooling temperature of 5 ° C for 60 minutes, for $G_{BOTUCRIO + 0,25}$ and $G_{BOTUCRIO + 0,50}$ for 20 minutes and $G_{MERCK + 0,25}$ and $G_{MERCK + 0,50}$ have not been cooling and submitted directly to the nitrogen steam for 20 minutes as like as the other groups. All of them were immersed in liquid nitrogen. Sperm parameters were evaluated by computerized analysis and plasma membrane integrity by epifluorescence microscopy. No interaction was observed between the extenders to the types of filling studied, so these were evaluated separately. In comparisons made between the extenders, we observed that the Botu-cryo® preserved better parameters of total and progressive sperm motility than the extenders Merck Gema and Inra82 (41.39%, 19.37% vs 15.44% ; 6.57% vs 9.04%, 3.06%, respectively - $P < 0.05$). For the parameters VAP, VSL and VCL (m / s), the Botu-cryo® showed higher ($P < 0.05$) compared to Merck gema and the Inra82 (78.87, 66.64, 150, 68 vs 67.17, 60.00, 109.41 vs. 63.8, 50.31, 121.12), but the parameters of VAP and VCL, Merck Gema and Inra82 were similar ($P > 0.05$). The Botu-cryo® achieved better results in the percentage of fast and medium sperm (25.60, 15.81 vs 7.82, 7.48 vs 4.61, 4.27 - $P < 0.05$). In relation to slow and static sperm, Merck Gema and Inra82 showed higher results (17.04, 67.59 vs 17.04, 65.51) with no difference between them ($P > 0.05$). No difference was observed between extenders in the percentage of intact sperm to Botu-cryo®, Merck Gema and Inra 82 (33.29 vs. 33.68 vs. 34.10). In relation to methods of filling studied, the variables evaluated showed no differences between them. By the results of this work, we can conclude that the semen samples cryopreserved with Botu-cryo® provided better results in the ratings post thawing when compared to the others. We can also observe from these results that did not occur differences in sperm viability after thawing using straws of 0.25 and 0.50 mL.

Key words: stallion, semen, cryopreservation, extender

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO, p.17

2. REVISÃO DE LITERATURA, p.20

2.1 OS ESPERMATOZÓIDES, p.20

2.2 MEMBRANA PLASMÁTICA, p.21

2.3 PRINCÍPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO E LESÕES QUE OCORREM NA CÉLULA ESPERMÁTICA, p.23

2.4 AGENTES CRIOPROTETORES, p.27

2.4.1 Agentes crioprotetores penetrantes, p.28

2.4.1.1 Glicerol, p.29

2.4.1.2 Etilenoglicol, p.32

2.4.1.3 Dimetilsulfóxido, p.33

2.4.1.4 Amidas, p.34

2.4.2 Agentes crioprotetores não penetrantes, p.35

2.4.2.1 Gema de ovo, p.36

2.4.2.2 Açúcares, p.37

2.4.2.3 Proteínas do leite, p.38

2.5 PRINCIPAIS CRIOPROTETORES UTILIZADOS PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES, p.39

2.6 FATORES INDIVIDUAIS RELACIONADOS A CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE GARANHÕES, p.44

2.7 ACONDICIONAMENTO DO SÊMEN, p.47

2.8 DESCONGELAMENTO, p.49

3. MATERIAL E MÉTODOS, p.51

3.1 LOCAL DO ESTUDO, p.51

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS, p.51

3.3 COLHEITA DO SÊMEN, p.52

3.4 MANIPULAÇÃO E AVALIAÇÃO INICIAL DO SÊMEN À FRESCO, p.52

3.5 PROCESSAMENTO DO SÊMEN PARA CONGELAMENTO, p.53

3.6	ADIÇÃO DOS DILUIDORES DE CONGELAMENTO,	p.54
3.7	ENVASE,	p.54
3.8	GRUPOS EXPERIMENTAIS,	p.55
3.9	CONGELAMENTO DAS PALHETAS,	p.55
3.10	DESCONGELAMENTO E AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA,	p.56
3.11.	CLASSIFICAÇÃO DOS GARANHÕES QUANTO A CONGELABILIDADE,	p.57
3.12	FLUXOGRAMA,	p.58
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA,	p.59
3.14	COMITÊ DE ÉTICA,	p.60
4.	RESULTADOS,	p.61
4.1	PARÂMETROS DE CONTROLE,	p.61
4.1.1	Biometria testicular, comportamento sexual e características físicas do sêmen dos garanhões,	p.61
4.2	PARÂMETROS DE RESULTADO,	p.63
4.2.1	Avaliação do sêmen fresco e diluído,	p.63
4.2.2	Avaliação do sêmen pós-descongelamento,	p.64
4.2.2.1	Efeito dos diluidores de congelamento e do tipo de envase,	p.64
4.2.2.2	Efeito dos diluidores de congelamento,	p.64
4.2.2.3	Efeito do tipo de envase,	p.67
4.2.2.4	Avaliação do índice de congelabilidade entre garanhões,	p.69
5.	DISCUSSÃO,	p.70
6.	CONCLUSÕES,	p.80
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS,	p.81
8.	ANEXOS,	p.98

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

C – carbono

C – Celsius

Ca⁺⁺ - cálcio

Cm – centímetros

CASA – Computer Assisted Semen Analyzes

DMSO – dimetilsulfóxido

DMF – dimetilformamida

DMA - dimetilacetamida

EG – etilenoglicol

GL- glicerol

H²O² – peróxido de hidrogênio

min – minutos

M – molar

ml – mililitro

MT – Motilidade total

MP – Motilidade progressiva

MF – metilformamida

MEDIUM – percentual de espermatozoides médios

O₂ – oxigênio

OH – grupo hidroxila

RAPID – percentual de espermatozoides rápidos

ROS – espécies oxigênio reativas

SPTZ – espermatozoides

SLOW – percentual de espermatozoides lentos

STATIC – percentual de espermatozoides estáticos

VAP – velocidade espermática ao longo de uma trajetória média

VSL – velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem no primeiro ponto analisado e final no último ponto.

VCL – velocidade espermática real

Vs – versus

μL – microlitros

$\mu\text{m/s}$ – micrômetro por segundo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Biometria testicular, comportamento sexual e características físicas do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador utilizado no estudo, p.55.

Tabela 2: Motilidade e vigor no pré-congelamento de sêmen fresco e diluído com diluidor de centrifugação e com diluidores de congelação de garanhões da raça Mangalarga Marchador (média \pm desvio padrão), p.62.

Tabela 3: Motilidade total (MT) e progressiva (MP) pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelados com os diluidores INRA 82, Botucrio e Merck Gema avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio padrão), p.63.

Tabela 4: Velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem no primeiro ponto analisado e final no último (VSL) e velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL) no pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelados com os diluidores INRA 82, Botucrio e Merck Gema avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio padrão), p.64.

Tabela 5: Percentual de espermatozóides rápidos (RAPID), médios (MEDIUM), lentos (SLOW) e estáticos (STATIC) no pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelados com os diluidores INRA82, Botucrio e Merck Gema avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio padrão), p.65.

Tabela 6: Percentual de espermatozóides íntegros no pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelados com os diluidores INRA 82, Botucrio e Merck Gema, avaliados pela microscopia de epifluorescência (média \pm desvio padrão), p.66.

Tabela 7: Motilidade total (MT) e progressiva (MP) pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador envasados em palhetas de 0,25 e 0,50ml avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio padrão), p.66.

Tabela 8: Velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem no primeiro ponto analisado e final no último (VSL) e velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL) no pós-descongelamento do sêmen de garanhões

da raça Mangalarga Marchador envasados em palhetas de 0,25 e 0,50 ml avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio padrão), p.67.

Tabela 9: Percentual de espermatozóides rápidos (RAPID), médios (MEDIUM), lentos (SLOW), e estáticos (STATIC) no pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador envasados em palhetas de 0,25 e 0,50ml avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio padrão), p.67.

Tabela 10: Percentual de espermatozóides íntegros no pós-descongelamento de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador envasados em palhetas de 0,25 e 0,50ml avaliados pela microscopia de epifluorescência (média \pm desvio padrão), p.68.

Tabela 11: Congelabilidade do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelado nos diluidores INRA82, Botucrio e Merck gema, p.68.

Tabela 12: Congelabilidade do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelado nos diluidores INRA82, Botucrio e Merck-gema, p.69.

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por animais de alto padrão racial, demonstrado através de suas características zootécnicas, torna premente a implantação de técnicas que permitam otimizar o aproveitamento de bons reprodutores, de forma a incrementar o aspecto qualitativo do plantel desta raça.

O desenvolvimento de novas biotecnologias visando à preservação e armazenamento de sêmen equino vem crescendo de forma incessante na equinocultura.

A criopreservação de sêmen é estudada desde a descoberta do agente crioprotetor glicerol na década de 40 (POLGE et al. 1949), o que permitiu que o espermatozóide fosse congelado e armazenado por longos períodos. Entretanto, a primeira gestação advinda do sêmen equino congelado só foi reportada na década de 50 por Barker & Gandier (1957).

O congelamento de sêmen trouxe vários benefícios ao sistema de produção dos equinos, facilitando o armazenamento por período indeterminado e a comercialização deste material genético, controlando doenças sexualmente transmissíveis, propiciando que a colheita do sêmen seja realizada durante todo ano, mesmo fora de estação de monta e principalmente, acelerando o ganho genético, sendo a melhor forma de seguro de garanhões (Alvarenga et al., 2000).

Embora o sêmen criopreservado venha sendo utilizado ao longo de 50 anos na indústria bovina, sua utilização na espécie equina continua limitada. O grande limitante desta técnica é a baixa fertilidade obtida, quando comparado com sêmen fresco e resfriado.

Para compor este cenário, os criadores ainda exigem que sejam desenvolvidas novas técnicas e diluidores no intuito de minimizar o problema

do congelamento de sêmen daqueles garanhões que possuem baixa congelabilidade.

A redução da taxa de fertilidade verificada após o processo de congelamento e descongelamento está relacionada principalmente aos danos causados ao funcionamento e às estruturas das membranas dos espermatozóides (PARKS & GRAHAM, 1992).

O uso do sêmen equino congelado permanece bastante limitado, em parte, pelas diferenças individuais de congelabilidade espermática existente entre garanhões e entre ejaculados do mesmo indivíduo e também pela reduzida capacidade dos espermatozóides equinos tolerarem os processos de congelamento e descongelamento.

Já foi comprovado que o fator racial interfere diretamente na resistência da célula espermática frente à técnica de criopreservação. A raça Mangalarga Marchador vem mostrando resultados insatisfatórios quanto a criopreservação de sêmen quando comparado a raças de cavalos de salto. Por esta razão, a maioria dos garanhões da raça Mangalarga Marchador são incluídos num grupo classificado como maus congeladores (aqueles que apresentarem motilidade total abaixo de 30% após o descongelamento quando congelados com glicerol).

A composição dos diluidores de congelamento de sêmen pode afetar os resultados do processo de criopreservação, sendo um dos fatores de maior preocupação entre os pesquisadores, embora o glicerol e a gema de ovo sejam substâncias crioprotetoras mais utilizadas nos meios de congelamento.

As amidas têm mostrado bastante eficiência na criopreservação de sêmen equino, principalmente nos garanhões considerados de baixa congelabilidade como os garanhões da raça Mangalarga Marchador (Alvarenga et al. 2000).

A criopreservação de sêmen equino, bem como de várias espécies, ainda não atingiu uma padronização da técnica que proporcione resultados satisfatórios e repetitivos, como ocorre na espécie bovina (WATSON, 2000). A maioria das pesquisas é realizada no intuito do aprimoramento da técnica de criopreservação, tendo em vista a obtenção de resultados mais consistentes.

Devido aos fatores citados, o presente estudo objetivou avaliar a utilização de três protocolos de criopreservação e seus efeitos na viabilidade espermática durante a criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, mediante as avaliações “in vitro” de motilidade espermática, vigor, integridade e funcionalidade da membrana plasmática pós-descongelamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. OS ESPERMATOZÓIDES

O espermatozóide é uma célula haplóide carente de citoplasma e outras organelas, exceto o núcleo, acrossoma e uma série de mitocôndrias num arranjo helicoidal localizado na região anterior do flagelo (MEDEIROS et al., 2002). Porém, o restante é ainda muito complexo, possuindo múltiplos compartimentos celulares, membranas e estruturas subcelulares. Um outro detalhe é o fato que o DNA destas células está condensado a ponto de impedir que seus genes se expressem, impossibilitando-a de realizar um auto-reparo a qualquer dano sofrido (GRAHAM, 1998).

As células espermáticas dos equinos, como a de todas as espécies de mamíferos, são altamente especializadas e são constituídas por cabeça, peças intermediária, principal e terminal, que tem como único objetivo à fertilização do óvulo (HAFEZ, 1995). O acrossoma é uma estrutura de dupla parede situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo. O colo conecta a cabeça do espermatozóide com a cauda, a qual é subdividida em peça intermediária, principal e terminal (GARNER & HAFEZ, 1995).

Após a ejaculação, os espermatozóides devem atingir o ístmo da tuba uterina, onde ocorrerá a fecundação. Após a fecundação, o DNA do espermatozóide se descondensa, o pró-núcleo masculino se forma e se liga ao pró-núcleo feminino e dá origem ao genoma diplóide do novo indivíduo. Portanto, para a obtenção de sucesso na concepção, os espermatozóides devem possuir membrana e organelas íntegras e funcionais e um genoma haplóide intacto (SNOECK et al., 2007).

Para que se possam obter bons índices de concepção após a criopreservação, é necessário que se conheça a estrutura dos espermatozóides e os danos causados durante o seu processamento, a fim de se minimizar ou eliminar tais danos (ALMEIDA, 2006).

2.2. MEMBRANA PLASMÁTICA

A célula espermática é revestida mais externamente pela membrana plasmática. A membrana plasmática é composta de uma camada bimolecular de lipídeos (fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol) e proteínas. É metabolicamente ativa e devido a sua composição, é impermeável a maioria das moléculas. Tem um importante papel de isolar a célula do meio exterior e mediar reações com o meio que a cerca, controlando o fluxo de água e eletrólitos (COOPER, 1996).

A estrutura básica da membrana plasmática de qualquer célula é o mosaico fluido, constituído por dupla camada lipídica entremeada por moléculas de proteína (SINGER, S.J et al., 1972). No modelo mosaico fluido, os fosfolipídeos tem uma camada hidrofílica externa e uma cadeia de ácidos graxos que se estende para o interior da membrana. Esta organização lamelar faz com que as cadeias de ácidos graxos promovam uma barreira hidrofóbica na qual a água e moléculas dissolvidas nela passam apenas com dificuldade. O transporte de moléculas é feito através de canais ou poros formados pelas proteínas, existindo pouco ou nenhum transporte de moléculas hidrofílicas em regiões da membrana sem poros ou canais. Mudanças na conformação da membrana, que podem ser ocasionadas pelo resfriamento, e que resultam em arranjos anormais dos fosfolipídeos e proteínas, permitem rápida passagem de moléculas que normalmente passariam através da membrana vagarosamente (AMANN e PICKETT, 1987).

As proteínas representam em torno de 50% do peso da membrana, porém membranas envolvidas em transporte de energia, por exemplo, podem

possuir até 75% do seu peso em proteínas (AMANN e PICKETT, 1987; JOHNSON, 1975 e STRYER, 1988).

A manutenção de concentrações adequadas intra e extracelulares de íons como sódio, potássio, cálcio e magnésio são regulados por bombas iônicas protéicas presentes nas membranas, e que dependem de ATP intracelular para atuar (AMANN e PICKETT, 1987). Os carboidratos da membrana constituem 2 a 10% do seu peso, e são açúcares aderidos externamente a glicolipídeos e glicoproteínas, sendo importantes no reconhecimento intercelular. O colesterol, provavelmente serve como substância estabilizadora de membrana (STRYER, 1988).

A integridade estrutural da membrana plasmática é determinada pela temperatura e pela solução que ela está banhada; na temperatura corporal a membrana está fluida. Essa característica é decorrente da ampla mobilidade lateral dos fosfolipídeos que, entretanto não possuem a mesma facilidade de se movimentar entre as faces externa e interna (AMMAN et al., 1993; COOPER, 1996; GRAHAM, 1998).

A fluidez da membrana plasmática é determinada por sua composição lipídica. Lipídeos com cadeias lineares saturadas apresentam maior cooptação entre si, assumindo formas mais densas e apresentando maior temperatura de fusão; já cadeias lineares insaturadas proporcionam menor temperatura de fusão (STRYER, 1988).

Nos seres eucariontes há colesterol agindo como elemento regulador de fluidez das membranas, posicionando-se com sua cadeia longa entre as cadeias lineares dos fosfolipídeos e interferindo na interação entre elas. Porções de membrana que possuem relação elevada entre colesterol e fosfolipídeos, principalmente se forem poliinsaturados, são mais resistentes a mudanças de temperatura (AMANN & PICKETT, 1987; JOHNSON, 1975 e STRYER, 1988).

De acordo com Flesh e Gadella (2000), em comparação a outras espécies como a bovina, a membrana plasmática dos espermatozóides

equinos possui uma quantidade de colesterol relativamente alta, em torno de 37%. Para Yanagimachi (1994), as diferenças na quantidade de colesterol podem afetar a fertilidade e a capacidade do ejaculado de um garanhão a suportar o resfriamento e congelamento.

A membrana plasmática tem papel fundamental nos procedimentos de resfriamento e congelamento de sêmen. Durante o resfriamento e o reaquecimento do sêmen, ocorrem alterações nas associações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína da membrana, as quais são necessárias para um funcionamento normal desta (PARKS e GRAHAM, 1992).

O conhecimento sobre a membrana plasmática dos espermatozóides é o ponto inicial para o êxito nos processos de manipulação do sêmen, principalmente tratando-se de espécies como a equina e a suína, as quais possuem baixa resistência dos espermatozóides à manipulação extra corpórea (VALLE e SILVA FILHO, 2001).

2.3. PRINCÍPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO E LESÕES QUE OCORREM NA CÉLULA ESPERMÁTICA

O processo de criopreservação constitui-se de várias etapas como a coleta do sêmen, primeira diluição, centrifugação, resfriamento, diluição com diluidor de congelamento, resfriamento, congelamento e descongelamento, aos quais, interativamente afetam seu sucesso (VIDAMENT et al., 2001).

A água pura congela e cristais de gelo são formados a 0°C, enquanto que o ponto de congelação de uma solução é determinado pela concentração de partículas que ela contém, como soluto (AMANN & PICKETT, 1987). À medida que a água congela, os espermatozóides ficam aprisionados em canais de solvente, que permanecem na forma líquida. Este processo resulta no aumento da concentração dos solutos no meio que permanece descongelado. Com o início da congelação, progressivamente, é gerado um gradiente osmótico, que força a água a sair dos espermatozóides, desidratando-os e

aumentando a concentração dos eletrólitos intracelulares. Estes eventos são denominados de efeito de solução (MAZUR, 1970). Uma alta concentração de solutos pode causar desidratação na célula espermática, levando a deformações celulares, danos na estrutura da membrana, desnaturação de proteínas, deslocamento de proteínas de membrana e desarranjos nas estruturas do citoesqueleto (GRAHAM, 1996).

Quando os espermatozóides são congelados numa taxa de temperatura moderadamente rápida (-25 a -40°C/min), a água do compartimento intracelular não congelará e irá se difundir para fora da célula espermática devido a alta concentração de soluto no meio extracelular. Este processo causará desidratação celular. Se a taxa de resfriamento for lenta, os espermatozóides se tornam suficientemente desidratados e não ocorre a formação de grandes cristais de gelo no meio intracelular. Entretanto, este processo resulta em alta concentração de solutos no meio intracelular que causam danos à célula espermática. Abaixo de -20°C, os espermatozóides começam a apresentar mudanças biofísicas, principalmente na membrana plasmática e, abaixo de -60°C sofrem efeitos de descompensação iônica e de lipídeos suficientemente graves para causar choque térmico (GRAHAM, 1996).

De acordo com Zúccari (1998), o ponto de congelamento do citoplasma celular está normalmente abaixo de -1°C, mas as células geralmente permanecem não congeladas na faixa entre -10 a -15°C, isto é, se encontram super resfriadas, mesmo quando o gelo está presente. Tal fato indica que a membrana plasmática pode prevenir a propagação do gelo extracelular para o interior da célula super resfriada. Considerando-se que a pressão de vapor de água super-resfriada é maior que a do gelo, as células começam a se equilibrar através da desidratação e ocorre uma concentração de eletrólitos no interior da célula. À medida que a solubilidade dos eletrólitos vai sendo ultrapassada, os solutos se precipitam alterando o pH e abaixo do ponto eutético do sistema, temperatura na qual não resta nenhum líquido, ocorrem à precipitação de todos os solutos.

Ainda segundo Zúccari (1998), existe uma dificuldade em se compreender o efeito de solução devido ao fato de pelo menos quatro fatores distintos estarem envolvidos durante o processo de congelação. São eles: 1) a água pura é removida em forma de gelo; 2) ocorre a concentração de solutos de alto e baixo peso molecular; 3) há a redução do volume celular; 4) os solutos se precipitam. Todos estes fatores têm sido estudados para explicar as lesões celulares, mas com exceção da precipitação de solutos, os demais dependem da temperatura e ocorrem simultaneamente durante o congelamento.

A criopreservação possui várias etapas que podem danificar os espermatozóides tais como: a mudança da temperatura, o estresse osmótico e tóxico causado pela exposição aos crioprotetores e a formação e dissolução de gelo no ambiente extracelular, assim, para que ocorra a união dos gametas, o espermatozóide deve manter condições básicas, como: metabolismo para a produção de energia, motilidade progressiva, integridade acrossomal e integridade das proteínas de membrana, objetivando a ligação com o gameta feminino e, finalmente, a fertilização (ALMEIDA, 2006).

Segundo Almeida (2006), os danos que os espermatozóides sofrem durante este processo podem ser ultra-estruturais ou físicos, bioquímicos ou funcionais. Os protocolos de criopreservação são feitos para minimizar tais efeitos negativos de estresse.

O problema da criopreservação não está na habilidade do espermatozóide em manter-se viável à temperatura de -196°C , mas sim nos danos que a célula sofre durante o resfriamento e o descongelamento, numa faixa de temperatura intermediária entre -15° e -60°C que os espermatozóides têm que passar duas vezes, uma no processo de congelamento e outra no descongelamento (AMANN e PICKET, 1987; PARKS e GRAHAM, 1992). O resfriamento rápido do sêmen equino entre 20° e 5°C predispõe o espermatozóide ao choque térmico. Nessa faixa crítica de temperatura o sêmen deve ser resfriado lentamente (Mc KINNON, 1996).

Holt (2000) diz que, em geral, qualquer célula viva, quando submetida ao processo de congelação, sofre algum dano decorrente das interações água-soluto que ocorrem durante a formação de cristais de gelo.

De acordo com Jasko (1994), o termo choque térmico descreve as mudanças que ocorrem no espermatozóide quando esses são rapidamente resfriados da temperatura corporal até 0°C.

Se o processo de congelamento é realizado inapropriadamente, os espermatozoides sofrerão choque térmico. Este por sua vez induz danos irreversíveis as células espermáticas caracterizados por movimentos anormais, perda rápida da motilidade, danos acrossomais e de membrana plasmática, redução do metabolismo celular e perda de componentes celulares. O primeiro choque térmico pelo qual as células espermáticas passam durante o processo de congelação ocorre durante o resfriamento de 37° a 5°C (GRAHAM, 1996).

A sensibilidade ao choque térmico varia de acordo com o grau de maturação do espermatozóide, espécie, variação individual e quantidade de plasma seminal, e pode ser determinada pelo conteúdo de colesterol da membrana e o grau de saturação dos ácidos graxos, os quais influenciam na fluidez da membrana plasmática (WATSON, 1981).

O resfriamento e a criopreservação desestabilizam as membranas espermáticas e conseqüentemente induzem reação acrossômica prematura, diminuindo a vida útil do espermatozóide no trato reprodutivo feminino e a fertilidade na inseminação artificial (WATSON, 1995).

A regulação de cálcio também é afetada pelo resfriamento, o que provoca sérios efeitos sobre a função celular. Para Watson (2000), o efluxo de cálcio resulta na capacitação e fusão entre membrana plasmática e a porção interna da membrana acrossomal externa, o que seria um processo desorganizado da reação acrossomal.

Estudos recentes indicam que espécies oxigênio-reativas (ROS) participam de um importante papel na função espermática e que sua produção desequilibrada ou sua degradação podem causar efeitos adversos nos

espermatozóides. Acredita-se ainda que a geração de ambos, O_2 e H_2O_2 estimulem a capacitação espermática através da elevação do AMPc , ativação da proteína Kinase A e indução da fosforilação da tirosina. O estresse oxidativo no sêmen ocorre como resultado de um desequilíbrio entre produção de ROS e sua capacidade antioxidante. A produção desequilibrada de ROS resulta em peroxidação de grande quantidade de lipídeos insaturados de membrana, diminuição da motilidade espermática, inicia fusão ovócito espermatozóide e causa danos no DNA (AITKEN, 1995; DE LAMIRANDE e GAGNON, 1999).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a geração de ROS pelos espermatozóides, que podem ser produzidas durante o metabolismo oxidativo, e o aumento de sua concentração pode ser devido à presença de espermatozóides anormais ou danificados. Ball et al. (2001) demonstraram que há um aumento de cinco vezes na produção de ROS após congelamento na espécie equina.

A determinação da taxa de resfriamento ideal para o espermatozóide equino é um dos assuntos mais importantes para a conservação da motilidade e da fertilidade. Este é um assunto complexo que envolve a individualidade do garanhão, constituição da membrana do espermatozóide, natureza do diluente e temperatura final de armazenamento (SILVA FILHO, 1994).

2.4. AGENTES CRIOPROTETORES

Para as células sobreviverem ao processo de criopreservação, é necessária a presença de agentes crioprotetores durante o resfriamento, congelamento e descongelamento.

Os agentes crioprotetores são definidos como a classe de componentes que especificamente atuam na manutenção da viabilidade das células animais ao congelamento e descongelamento (GILMORE et al., 1997).

Segundo Gao et al. (1993), a adição de crioprotetores implica em estresse osmótico na membrana plasmática dos espermatozóides,

dependendo da relativa permeabilidade dos crioprotetores. Além disso, Santos (2003) destaca que os espermatozóides são altamente sensíveis aos efeitos tóxicos dos crioprotetores, que dependem principalmente da concentração utilizada e do período de exposição das células a esses agentes.

A habilidade de um componente agir como um eficiente crioprotetor depende de sua capacidade de conferir proteção aos espermatozóides contra os danos térmicos e ter baixo potencial de toxicidade para as células espermáticas. Esta capacidade protetora de um composto é dependente do número de pares de cadeias simples de elétrons que ele contém, a simetria esférica destas cadeias e sua solubilidade na água (NASH, 1966).

Acredita-se que a variação no volume celular, decorrente da entrada e da saída do crioprotetor e da água (choque osmótico), seja uma das principais causas da baixa viabilidade do sêmen após a descongelação. A utilização de crioprotetores com alta permeabilidade as células espermáticas é desejável pela possibilidade de minimizar o choque osmótico (GOMES et al., 2002).

Os crioprotetores podem ser divididos em dois grupos: os penetrantes, que atravessam a membrana plasmática do espermatozóide e atuam no meio intracelular e extracelular. Neste grupo estão as pequenas moléculas como o etilenoglicol, glicerol, propilenoglicol, dimetilsulfóxido, acetamida e outras amidas; e os não penetrantes, que são grandes moléculas que não atravessam a membrana plasmática e podem ser proteínas como as presentes no leite, na gema de ovo, açúcares e polímeros sintéticos (PICKETT e AMANN, 1993; Mc KINNON, 1996, LEIBO e BRADLEY, 1999).

2.4.1 Agentes Crioprotetores Penetrantes

Os crioprotetores penetrantes possuem um mecanismo de ação baseado em suas propriedades coligativas ou propriedades de ligação com a molécula da água, ou seja, os agentes crioprotetores penetrantes têm estruturas que promovem ligações de hidrogênio com a molécula da água. São

estas ligações que mudam a orientação desta nos cristais de gelo e cria um ambiente menos nocivo para as células espermáticas, portanto, esta propriedade modifica as características durante o processo de congelação limitando a formação de cristais de gelo, retardando o crescimento dos cristais e reduzindo as concentrações de soluto no meio extracelular, com meio intracelular (NASH, 1966; ROWE, 1966; WATSON, 1979; DALIMATA e GRAHAM, 1997).

De acordo com Watson (1995), estes diminuem o ponto crioscópico intracelular, de maneira que uma quantidade maior de água vai permanecer no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos, propiciando um ambiente menos deletério à célula espermática durante o congelamento.

Nash (1966) afirma que as características físico-químicas ideais que um agente crioprotetor penetrante deve possuir são as seguintes: baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e principalmente uma baixa toxicidade celular.

2.4.1.1 Glicerol

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), sendo atualmente o agente mais utilizado nas espécies mamíferas domésticas (FASTARD, 1996).

Silva et al. (2003) apresentam o glicerol – um álcool polihídrico altamente permeável – como o crioprotetor mais empregado na congelação de sêmen nas diferentes espécies, desde sua primeira utilização em 1950 por Smith e Polge. Também Doebber (1966) afirma que, ligado fortemente aos íons de hidrogênio na molécula de água, o glicerol é um soluto que, por sua atividade crioprotetora é considerado eficiente, pois torna mais lenta a desidratação osmótica a que a célula é submetida durante a congelação.

Segundo Graham (1996), o glicerol é o crioprotetor de escolha para a criopreservação de sêmen equino. Se utilizado em baixa concentração, seu efeito de preservar os espermatozóides durante o congelamento fica reduzido, entretanto quando em altas concentrações, apresenta efeito tóxico e contraceptivo reduzindo as taxas de fertilidade. Apesar de apresentar toxicidade para a célula e comprometer a fertilidade, ainda não foi encontrado um crioprotetor que o substitua com maior eficiência de crioproteção (AMANN e PICKETT, 1987).

A maioria dos diluidores utilizados para congelamento contém entre 2,5 a 5% de glicerol em sua composição. Cochran et al. (1984), utilizando o diluente Lactose-EDTA-gema de ovo no congelamento verificaram que o glicerol a 4% mostra-se superior às concentrações de 2 ou 6%.

A concentração ótima do glicerol, segundo Watson (1995), está entre 1 e 2M (MOLAR) , mas a utilização da solução a 0,5M minimiza os efeitos tóxicos das altas concentrações de glicerol na célula. Já, segundo Amann e Pickett (1987), a concentração ideal do glicerol varia entre 3 a 4%. Por sua vez, Watson (1995), afirma que estes níveis do crioprotetor são eficientes para preservar a motilidade, porém para minimizar danos ao acrossoma são necessárias concentrações menores que 1 ou 2%.

De acordo com Graham (1996), um leve aumento na concentração do glicerol (0,5 a 1%) pode melhorar a porcentagem de espermatozóides móveis em amostras de sêmen após o congelamento. Entretanto, de acordo com Keith (1998), a concentração de glicerol ideal para a sobrevivência do espermatozóide é espécie dependente, variando de acordo com a curva de congelação, de outros componentes do diluente e ainda do método de envase.

De acordo com Vidament et al. (2001), o glicerol é um crioprotetor essencial na maioria dos diluidores convencionais utilizados para congelamento de sêmen equino, variando entre 2,5 a 6% em sua concentração.

O uso do glicerol na criopreservação do sêmen equino pode estar relacionado à baixa motilidade pós descongelação e redução da fertilidade. O efeito tóxico do glicerol tem sido relatado por muitos autores, 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).

Segundo Gilmore et al. (1995), a toxicidade é devido ao estresse osmótico pela lenta entrada do glicerol na membrana da célula quando comparado aos outros crioprotetores. Portanto, o glicerol possui um efeito direto na membrana plasmática alterando sua fluidez.

Os efeitos tóxicos do glicerol podem ser de natureza osmótica, de mudanças na organização, na fluidez e na permeabilidade da membrana, e também por injúrias bioquímicas que ocorrem devido à interação entre este crioprotetor e os componentes dos espermatozóides (WATSON, 1995).

Ball e Vo (2001) avaliaram a tolerância osmótica do espermatozóide equino quanto à adição e remoção de diferentes agentes, concluindo que a adição e a remoção do glicerol resultaram em maior estresse osmótico, caracterizado por uma redução de motilidade e pela diminuição da integridade celular e acrossomal, quando comparado aos outros crioprotetores estudados.

Segundo revisão feita por Mc Kinnon (1996), o glicerol altera a pressão osmótica do diluidor e do espermatozóide. Crioprotetores solúveis, como o glicerol, funcionam como solvente com ponto de congelamento mais baixo que o da água, e permitem a formação de canais de diluidor descongelados nos quais residem os espermatozóides.

2.4.1.2 Etilenoglicol

O etilenoglicol, também é quimicamente definido como álcool, possui quatro pares de elétrons isolados e tem a possibilidade de ligação com átomos de hidrogênio em quatro sítios e a possibilidade de doar dois hidrogênios (KEITH, 1998), podendo também efetuar ligações de hidrogênio na membrana dos espermatozóides (KUNDU et al., 2000).

O etilenoglicol, semelhante ao glicerol, é uma molécula altamente hidrofílica, que possui uma proporção de átomos de carbono (C) e grupos hidroxila (OH) de 1:1 (GORDON, 1996).

Por ser uma molécula menos tóxica do que os outros crioprotetores penetrantes, é empregado com frequência no congelamento de embriões bovinos, e alguns trabalhos demonstraram sua maior eficiência de criopreservação quando comparado ao glicerol (DOCHI et al., 1995).

Num estudo comparativo do glicerol e outros crioprotetores dentre eles etilenoglicol, dimetilformamida e dimetilsufóxido utilizando 10 ejaculados de 10 garanhões constatou-se a equivalência no uso dos crioprotetores, com exceção do dimetilsufóxido o qual manifestou resultado inferior (ALVARENGA et al., 2000). Outro estudo comparativo entre etilenoglicol e glicerol demonstrou atuação semelhante destes, sendo que quando combinados possibilita a redução do teor de glicerol, diminuindo o seu efeito tóxico (ALVARENGA et al. 2000).

Estudos preliminares de Mercadante et al. (1995) utilizando o etilenoglicol como crioprotetor, mostraram não haver diferença significativa entre este e o glicerol com relação à motilidade pós descongelamento e a fertilidade pós inseminação artificial, apesar de apresentar uma tendência ao melhor desempenho do etilenoglicol.

2.4.1.3 Dimetilsulfóxido (DMSO)

Dimetilsulfóxido 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. Apresenta como inconveniente à 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 e BRYANT, 2001).

Em soluções aquosas, o DMSO apresenta em seu ponto eutético, interações com a molécula da água formando complexos nas proporções de três moléculas de água para uma molécula de DMSO (3:1) e duas moléculas de água para uma de DMSO (2:1). Seu radical sulfóxido (S=O) tem a capacidade de formar fortes ligações de hidrogênio com os grupos OH, diminuindo assim o ponto de congelação da solução (MURTHY, 1998).

Tem-se que o DMSO também atua como uma molécula eletricamente carregada, a qual interage eletrostaticamente com os grupos fosfatos das membranas internas e externas dos espermatozoides, promovendo certa proteção contra eventuais danos causados pela criopreservação (KUNDU et al. 2000).

Tanto isoladamente como em associação com o glicerol, o dimetil sulfóxido aumenta a motilidade pós-descongelação do sêmen bovino. A combinação de ambos para o sêmen canino tem sido efetuada com êxito. Em células espermáticas de peixe, o dimetilsulfóxido é usado em teores acima de 12,5%. Com relação à espécie equina, ao ser adicionado em concentrações entre 1 a 9% em um diluente contendo lactose, gema de ovo e citrato, combinado ou não com o glicerol, apresenta maior viabilidade espermática pós descongelação quando congelado com 5% de dimetilsulfóxido, sendo este protocolo superior ao do uso isolado de glicerol (KEITH, 1998). Em coelhos os resultados não apenas de motilidade, como também de fertilidade, tem sido

alcançados através de crioprotetores como o dimetilsufóxido, etilenoglicol e amidas (DALIMATA e GRAHAM, 1997).

2.4.1.4 Amidas

Estudos recentes têm demonstrado bons resultados ao serem utilizadas amidas, tais como acetamida, metilformamida e dimetilformamida como crioprotetores no congelamento de sêmen de equinos (GOMES et al., 2002; MEDEIROS et al., 2002; VIDAMENT et al., 2002).

Um crioprotetor ideal deve possuir um baixo peso molecular, boa solubilidade em água e mínima toxicidade. Devido à maioria das amidas possuírem um menor peso molecular em relação ao glicerol, esses crioprotetores induzem menos danos osmóticos aos espermatozóides. (ASHWOOD-SMITH, 1987).

Ball e Vo (2001) relatam que as amidas apresentam três sítios de ligação de hidrogênio com a molécula de água, ou seja, a metade em comparação ao glicerol. No entanto, por possuírem menor viscosidade e maior solubilidade à água em relação ao glicerol, permitem maior permeabilidade da membrana diminuindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causados pelos crioprotetores.

Teoricamente, o resfriamento rápido e altas taxas de congelamento parecem ser desejáveis para o congelamento de sêmen utilizando as amidas por causa das diferenças na permeabilidade e do peso molecular entre o glicerol e as amidas (KEITH, 1998).

As adições de grupo metil nas moléculas de acetamida e formamida foram mais efetivas quanto à capacidade crioprotetora de sêmen equino quando comparadas a moléculas sem o grupo metil, sugerindo assim que a estrutura da molécula das amidas determina parcialmente sua habilidade crioprotetora (KEITH, 1998).

Dimetilformamida e metilformamida são crioprotetores que vem sendo utilizados com grande sucesso na congelação de sêmen equino. Seu uso para congelação de sêmen de garanhões com boa congelabilidade não proporciona aumento da motilidade e sim resultados semelhantes ao glicerol (KEITH, 1998).

Segundo Alvarenga et al. (2000), as amidas apresentaram resultados bastante favoráveis nos diversos parâmetros espermáticos avaliados, em especial para garanhões que apresentam resultados desfavoráveis com o uso do glicerol.

Entre as diferentes amidas, a dimetilacetamida foi a que menos conferiu proteção aos espermatozóides contra os danos durante o congelamento e descongelamento. Isto se deve ao alto peso molecular da dimetilacetamida (87,12M) quando comparado com dimetilformamida (73,09M) e metilformamida (50,07M) (ALVARENGA et al., 2005).

A superioridade da metilformamida em relação às outras amidas utilizadas provavelmente é atribuída ao fato do seu baixo peso molecular, resultando em menos danos osmóticos a célula espermática (MELO et al., 2007).

Segundo Squires et al. (2004), acetamida e formamida promovem baixa crioproteção aos espermatozóides. Lactamida promoveu melhores resultados de motilidade pós-descongelamento do que o glicerol, acetamida e formamida.

2.4.2 Agentes Crioprotetores Não penetrantes

Algumas substâncias, dentre as quais os lipídeos, proteínas e macromoléculas, são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelação sem que para isso necessitem penetrar no espermatozóide, são estes; a gema de ovo, leite, alguns açúcares e a albumina sérica bovina (KEITH, 1998).

Amann e Pickett (1987) afirmam que estas substâncias são responsáveis por um mecanismo de proteção no meio extracelular. Algumas

atuam através de um efeito osmótico, no qual é induzida a saída da água do interior da célula para prevenir a formação de cristais de gelo no meio intracelular, sendo que outras, promovem uma maior estabilidade da membrana plasmática.

2.4.2.1 Gema de ovo

Na maioria das vezes, o componente mais utilizado na composição dos diluidores de crioproteção, usados para sêmen de garanhões, incluem o glicerol e a gema de ovo (CLULOW et al., 2007).

A gema de ovo no meio diluente de criopreservação beneficia os espermatozoides ao manter a pressão colóide-osmótica do meio, e também, por ser uma lipoproteína com baixa densidade, estabiliza a membrana espermática durante a congelação e descongelação (FOULKES, 1977; WATSON, 1990).

Holt (2000) revisou os aspectos relacionados a congelação de sêmen e concluiu que os efeitos crioprotetores da gema de ovo estão envolvidos com a porção lipoprotéica de baixa densidade (lecitina), a qual protege as células espermáticas do choque térmico, da fase de transição dos lipídeos e dos danos à membrana plasmática a temperaturas abaixo do ponto de congelação da solução.

Acredita-se que fosfolipídeos, colesterol e lipoproteínas de baixa densidade compostas na gema de ovo devem ser os fatores que garantem proteção aos espermatozoides contra o choque térmico durante o processo de congelamento e descongelamento (CLULOW et al., 2007).

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 bode e touros contra o choque térmico. Lipossomas que compõem o colesterol e a fosfatidilserina protegem o espermatozoide de bovinos e garanhões dos

danos do processo de congelação possivelmente por prevenir das alterações deletérias durante a criopreservação (Wilhelm et al., 1996). Os mesmos autores descreveram que a prevenção conferida pelos lipídeos com relação ao choque térmico parece estar relacionada a quelação do íon Ca^{++} do meio, evitando sua entrada no espermatozóide. É possível que os lipossomas interajam com o cálcio e outros componentes do meio de congelação que afetem a tonicidade ou a fração da água não congelada durante a criopreservação.

Segundo Clulow et al., (2007), as concentrações de gema de ovo nos diluidores usados para congelação de sêmen equino variam de 2 a 20 %. Vidament et al. (2001) relata que o aumento na concentração de gema de ovo de 2 para 4% não melhorou a motilidade pós descongelamento. A concentração ideal de gema de ovo ainda não está completamente estabelecida, esta, provavelmente dependerá do diluidor utilizado e do nível de glicerol e leite.

2.4.2.2 Açúcares

Os açúcares são crioprotetores não penetrantes e agem minimizando o estresse osmótico durante o congelamento. De acordo com Holt (2000) os açúcares desempenham importante papel no meio diluente de congelação. Atuam, basicamente, como substrato para a produção de energia pelos espermatozóides, mantendo a pressão osmótica do diluente, aumentando a quantidade de água não congelada em temperaturas abaixo do ponto de congelação desta e reduzindo a concentração de sais na solução não congelada.

Segundo Yildiz et al. (2000), além de atuarem como crioprotetores, os açúcares são substrato energético para o espermatozóide durante a incubação, conferem proteção à membrana plasmática durante a congelação e a descongelação, 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 fosfolípidos. Por restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolípidos, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema. Geralmente os dissacarídeos sacarose e trealose, são os 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).

Rafinose tem sido o açúcar mais utilizado na criopreservação de sêmen de ratos com o intuito de promover a hipertonicidade necessária para desidratar a célula antes da congelação (STOREY et al., 1998). Seu uso na criopreservação de sêmen equino demonstrou melhores resultados quando comparado à sacarose e sugeriu o uso de uma associação glicose-lactose-rafinose (NAGASE, 1967).

Henry et al. (2002) observou que os efeitos tóxicos da acetamida à célula espermática do garanhão podem ser minimizados com a incorporação de trealose e metilcelulose aos diluidores. Trealose confere proteção através do efeito osmótico e das interações específicas com os fosfolípidos de membrana (KEITH, 1998; AISEN, 2002).

2.4.2.3 Proteínas do leite

As proteínas do leite exercem um papel na criopreservação, semelhante ao da gema de ovo, não sendo, contudo capaz de substituí-la plenamente. A eficiência dos meios diluentes à base de leite tem sido atribuída a sua composição protéica que atua como tampão e à propriedade quelante frente a metais pesados, havendo relatos de sua parcial proteção contra a redução da temperatura durante o processo de refrigeração (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Nos equinos, comumente utilizam-se os diluentes à base de leite ou gema de ovo. A maioria contém fonte de lipoproteínas sendo que as proteínas do leite são capazes de estabilizar elementos protéicos da membrana do espermatozóide (WATSON, 1981).

Hochachka (1986) observou que a caseína liga-se fortemente aos íons Ca^{++} , o que impede o acúmulo intracelular de quantidades tóxicas de Ca^{++} resultante do dano causado nas membranas. As lipoproteínas são ligadas à membrana plasmática e promovem estabilização da mesma durante o processo de congelação/descongelação.

2.5 PRINCIPAIS DILUIDORES E CRIOPROTETORES UTILIZADOS PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GANHÕES

Diversos estudos têm sido realizados no intuito de avaliar crioprotetores para congelamento de sêmen equino, particularmente atribuídos à toxicidade do glicerol, quando utilizado em altas concentrações. O uso de outros crioprotetores adicionados ao glicerol melhorou a motilidade pós-descongelamento de ganhões considerados maus congeladores (MELO et al., 2007).

Em diluentes de congelação para sêmen de ganhões, os crioprotetores mais comumente utilizados são: glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e as amidas. Sendo o glicerol o crioprotetor penetrante mais utilizado nos meios de congelação em concentrações de 2 a 5% (KEITH, 1998).

Na busca de alternativas de substâncias crioprotetoras para congelação do sêmen equino, Keith (1998), avaliou várias formas de amidas (formamida, metilformamida, dimetilformamida, acetamida e metilacetamida) como agentes crioprotetores em comparação com o glicerol, em meio usado para congelamento de sêmen de ganhões e encontrou que a metilformamida (0,9M) foi superior em aumentar a motilidade total dos espermatozóides de ganhões no tempo 0 pós-descongelamento em relação ao glicerol

0,55M(54,2% a 51,6%, respectivamente) e no tempo 20 minutos pós descongelamento a metilformamida (0,6M) também foi superior ao glicerol 0,55M (50,6% a 41,7%, respectivamente), em relação a motilidade progressiva. A metilformamida 0,9 M no tempo 0 minutos foi superior ao glicerol 0,55 M (34,8% a 29,4%, respectivamente) e no tempo 20 pós-descongelamento metilformamida 0,6 M foi mais eficiente do que o glicerol (30,0% a 23,3%, respectivamente) na preservação da viabilidade celular.

Em estudo realizado por Melo et al. (2007), o uso do glicerol em baixas concentrações promoveu resultados superiores na viabilidade espermática pós-descongelamento quando combinado com as amidas ou até mesmo quando usado sozinho como crioprotetor. Entretanto, a toxicidade do glicerol foi observada quando processado sêmen de garanhões que são maus congeladores, sendo minimizado através da combinação do glicerol com as amidas.

Diferentes concentrações de glicerol (entre 1,5 a 4,5%) não têm efeito significativo na motilidade pós-descongelamento, porém 2,4 a 2,8% resultaram numa pequena melhora da motilidade, porém não significativa (VIDAMENT et al. 2001).

Segundo Alvarenga et al. (2005), os espermatozoides equinos possuem uma limitada tolerância osmótica, e dentre os quatro crioprotetores estudados (glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida), o glicerol foi o que induziu um estresse osmótico mais marcante, com severas alterações em variáveis de motilidade, viabilidade celular e integridade acrossomal.

O uso combinado de crioprotetores confere maior proteção em relação ao seu uso isolado (DALIMATA e GRAHAM, 1997). Assim sendo, a associação da dimetilformamida e do glicerol conforme a composição do meio diluidor MP 50, proporcionou uma melhor proteção da célula espermática durante a congelação, pois além da obtenção de excelentes resultados laboratoriais pós descongelação manifestou índices de fertilidade superiores aos descritos na literatura. Este diluente combina os dois agentes citados, sendo também

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 mostrou-se extremamente favorável à proteção do espermatozóide equino durante o processo de congelação (PAPA et al., 2002).

De acordo com Squires et al. (2004), a dimetilformamida sozinha ou em combinação com glicerol, promoveram altas taxas de motilidade pós-descongelação do que o uso do glicerol sozinho.

A combinação de dimetilformamida a 2,5% e metilformamida a 2,5% no Inra 82 tem demonstrado melhora na motilidade pós-descongelamento.

Estes crioprotetores alternativos são mais efetivos para criopreservação de espermatozoides daqueles ganhões cujas células espermáticas não sobrevivam bem ao glicerol (SQUIRES et al., 2004).

Ainda segundo Squires et al. (2004), demonstrou-se que tanto metilformamida quanto dimetilformamida protegem os espermatozoides equinos dos danos relacionados ao congelamento tão efetivamente quanto o glicerol. No entanto, estes crioprotetores constituem uma alternativa para ganhões com espermatozoides que apresentam baixa motilidade pós-descongelamento quando congelados com glicerol.

Alguns trabalhos demonstraram que a dimetilformamida preservou os espermatozoides equinos similarmente ao glicerol (ALVARENGA et al., 1996; KEITH,1998), quando utilizados em ganhões com altos índices de congelabilidade.

Medeiros et al. (2002), demonstraram que a motilidade pós-descongelação (total e progressiva) foi maior quando os espermatozoides foram congelados em presença de 3% de dimetilacetamida, comparado com glicerol a 5%, no entanto a motilidade foi similar na presença de 5% de dimetilformamida ou 5% de metilformamida. Os resultados de motilidade total e progressiva para os diferentes tratamentos foram: dimetilacetamida 3% (50% e

15%); metilformamida 5% (49% e 10%); dimetilformamida 5% (52% e 12%) e glicerol 5% (27% e 8%).

De acordo com Alvarenga et al. (2000), em um experimento realizado, sete de 10 garanhões apresentaram melhores resultados de parâmetros de motilidade espermática com dimetilformamida do que com glicerol.

Segundo Gomes et al. (2002), dimetilformamida e metilformamida mostraram atuar melhor na preservação da célula espermática frente a criopreservação. Dimetilformamida constitui-se uma excelente alternativa para promover a melhora da preservação espermática de garanhões considerados maus congeladores. Somente dois de dezessete garanhões da raça Mangalarga Marchador demonstraram boa qualidade espermática após descongelamento quando utilizado o glicerol.

Em estudo de Alvarenga et al. (2003) utilizando 55 garanhões de diferentes raças (Quarto de Milha, Puro Sangue, Árabe, Campolina, Mangalarga Marchador e Lusitano) foi utilizado como crioprotetor 5% de dimetilformamida ou 5% de glicerol. Comparando estes dois, o resultado demonstrou melhor motilidade progressiva e total em 40 dos 55 garanhões quando utilizada a dimetilformamida. A porcentagem de motilidade progressiva dos espermatozóides congelados com glicerol pós-descongelamento foi maior do que 40% em 38% dos garanhões estudados (21/55) e acima de 80% (44/55) para o grupo que utilizou a dimetilformamida. A comparação dos dados de todos os garanhões mostrou uma superioridade da dimetilformamida ($p < 0,05$) em manter a motilidade pós descongelamento total (dimetilformamida = 50% e glicerol = 33%) e a motilidade espermática progressiva (dimetilformamida= 19% e glicerol = 15%).

O diluidor Botucrio possui baixa concentração de glicerol (1%) e utiliza metilformamida (4%) como o principal crioprotetor. Metilformamida possui um peso molecular mais baixo do que o glicerol (59M vs 92M), provavelmente induzindo menos estresse osmótico e melhorando a resistência espermática ao

processo de congelamento, após um longo período de resfriamento (MELO et al., 2007).

O fator que pode elucidar algumas variações entre os crioprotetores pode basear-se em observações feitas pelo estudo realizado por Arruda (2000), no qual evidenciou-se uma interação entre o meio diluidor de congelamento e o crioprotetor. Neste estudo foram utilizados os meios de congelamento Lactose-EDTA-gema de ovo, INRA 82 e meio à base de leite desnatado e os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. Quando se utilizou o meio diluente lactose EDTA-gema de ovo, os crioprotetores não apresentaram diferenças entre as avaliações efetuadas, contudo com a utilização dos meios INRA 82 e do meio diluente de congelamento à base de leite e etilenoglicol apresentou uma tendência de melhoria nos parâmetros avaliados.

Na grande maioria dos estudos com sêmen congelado de equinos o diluidor empregado têm sido o meio Edta-lactose-gema de ovo, proposto por Martin et al. (1979), com resultados de fertilidade bastante variáveis entre os diversos trabalhos publicados.

Papa et al. (1984), testaram a eficiência de um diluidor para congelamento de sêmen equino à base de glicina-gema, comparando-o com o meio padrão Edta-lactose-gema, e obtiveram maiores valores de motilidade e vigor espermático, integridade acrossômica e resistência espermática nos ejaculados tratados e congelados com glicina-gema.

Moffet et al. (2003), compararam dois diluentes utilizados para congelamento de sêmen equino e não encontraram diferenças na motilidade pós-descongelamento quando utilizado a dimetilformamida em meio Edta-lactose-gema de ovo sem resfriamento antes do congelamento, e em meio à base de leite desnatado mais gema de ovo mantido a 5°C por 2 horas antes do congelamento. Estes resultados mostraram que o sêmen de equinos podem ser congelados numa taxa acima de $-70^{\circ}\text{C}/\text{min}$ em um meio à base de leite desnatado com gema de ovo contendo dimetilformamida ou metilformamida como crioprotetor de escolha. Entretanto, a estabilização de sêmen a 5°C antes

do congelamento é necessária com o uso deste diluidor contendo dimetilformamida e metilformamida.

Em um experimento utilizando um ejaculado de 20 garanhões de raças distintas, foi demonstrado que espermatozóides congelados com dimetilformamida sozinho obtiveram melhor motilidade do que congelado com outros crioprotetores adicionados a dimetilformamida. Em um estudo desenvolvido no Brasil, Medeiros et al. (2002), avaliaram várias amidas no congelamento de sêmen de garanhões em comparação com o glicerol e observaram melhorias significativas no parâmetro de motilidade total computadorizada com a utilização da dimetilformamida a 5% (v/v). A utilização da metilformamida a 5% e da dimetilacetamida a 3% proporcionou melhores resultados de motilidade progressiva em comparação com os outros crioprotetores.

De acordo com estudo realizado por Gomes et al. (2002), mostrou-se que tanto dimetilformamida quanto metilformamida parecem ser bons crioprotetores no que diz respeito à preservação das células espermáticas contra os danos do congelamento. Dimetilformamida é uma excelente alternativa para melhorar a preservação dos espermatozoides de garanhões considerados maus congeladores. Ficou claramente demonstrado que garanhões da raça Mangalarga Marchador são considerados maus congeladores, pois somente dois dos 17 estudados mostraram boa qualidade seminal após serem congelados/descongelados com glicerol.

2.6 FATORES INDIVIDUAIS RELACIONADOS A CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE GARANHÕES

É estimado que somente 30 a 40% dos garanhões produzem sêmen de qualidade desejável para a criopreservação, e consistentes variações na congelabilidade do sêmen foram observadas entre as raças (ALVARENGA et al., 2003). Os espermatozóides de garanhões podem responder bastante

diferentes a criopreservação. É estimado que 25 a 30% dos garanhões produzam sêmen de boa qualidade para o congelamento, 25 a 50% produzam sêmen de qualidade moderada e 25 a 40% de má qualidade para o congelamento. Além disso, diferentes ejaculados provenientes do mesmo indivíduo irão exibir algumas diferenças na sua habilidade frente ao congelamento (GRAHAM, 1996).

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

De acordo com Medeiros (2007), dos 27 garanhões avaliados, nove (33%) apresentaram congelabilidade aceitável e eram pertencentes às raças Westfallen e Brasileiro de Hipismo, seis (22%) se enquadraram em um grupo intermediário, sendo este composto de um garanhão da raça Quarto de Milha, dois garanhões da raça Árabe, dois Mangalarga Marchador e um Westfallen. Em relação aos resultados pós descongelamento do grupo de garanhões com congelabilidade não aceitáveis enquadraram-se 12 animais da raça Mangalarga Marchador (45%).

Sabe-se que a maioria dos garanhões da raça Mangalarga Marchador têm a característica de ter uma pobre qualidade seminal pós-descongelamento quando glicerol é utilizado como crioprotetor (ALVARENGA et al., 2003).

Segundo Gomes et al. (2002), é provado que exista um fator racial que interfira na resistência espermática ao congelamento. A raça Mangalarga Marchador tem mostrado piores resultados a criopreservação quando comparados a cavalos de salto (Hanoveriano, Holsteiner e Trackenner) e Quartos de Milha. Por esta razão, a maioria dos garanhões desta raça são incluídos num grupo classificados como maus congeladores, isto é, garanhões que apresentam motilidade total abaixo de 30% após serem descongelados com crioprotetor glicerol.

Em outro experimento utilizando somente garanhões da raça Mangalarga Marchador (n=17), a utilização de dimetilformamida e metilformamida melhoraram a maioria dos parâmetros avaliados em comparação com glicerol e dimetilacetamida (GOMES et al., 2002).

Ainda em estudo de Gomes et al. (2002), trabalhando com sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, obtiveram resultados superiores de motilidade total computadorizada e integridade de membrana com a utilização de metilformamida e dimetilformamida a 5% (v/v) em comparação ao glicerol. Após descongelamento do sêmen, o percentual de motilidade espermática total e progressiva (%), analisado através do CASA para os crioprotetores dimetilformamida, metilformamida, dimetilacetamida e glicerol foram respectivamente: 42,75 e 13,50; 37,62 e 14,87; 30,25 e 12,12 e 15,56 e 5,62, mostrando haver uma superioridade da dimetilformamida em preservar a motilidade total.

Alvarenga et al. (2003), em estudo onde objetivou relacionar as variações de congelabilidade entre raças utilizando os crioprotetores dimetilformamida a 5% e glicerol a 5%, constatou num universo de 55 garanhões de diferentes raças, que os parâmetros de motilidade total e progressiva (CASA) foram superiores em relação a dimetilformamida na maioria dos garanhões utilizados (40 de 55 indivíduos) e também observou uma melhoria nos parâmetros avaliados em garanhões que apresentavam uma sensibilidade ao glicerol.

Em relação à preservação da integridade acrossomal, Landim-Alvarenga et al. (2005), concluíram que os crioprotetores à base de amidas, principalmente a dimetilformamida e a metilformamida, foram mais eficientes em preservar este parâmetro pós-descongelamento, em relação ao glicerol, em avaliações de microscopia eletrônica por sondas fluorescentes.

É sabido que o glicerol possui um efeito direto na membrana plasmática alterando sua fluidez (HAMMERSTEDT e GRAHAM 1992). A variação na fluidez de membrana plasmática pode ser uma explicação para esta variabilidade na congelabilidade de sêmen observada entre garanhões individuais.

2.7 ACONDICIONAMENTO DO SÊMEN

Inicialmente, o sêmen destinado ao congelamento era basicamente envasado de quatro maneiras: ampolas de 5 a 10ml, pellets de 2ml, palhetas de vinil de 1ml e sacolas plásticas. Entretanto, a identificação, manuseio e o armazenamento destes tipos de envase eram problemáticos. Posteriormente, surgiram os macrotubos e finalmente as palhetas, sempre aumentando a superfície de contato do diluente contendo os espermatozóides com o meio externo. Estas modificações propiciaram uma troca de calor mais rápida e homogênea permitindo o resfriamento ou aquecimento das amostras como um todo, minimizando assim a taxa de lesões da membrana plasmática (Dell Aqua Jr, 2000).

Segundo Papa et al. (1991), outro aspecto que já mereceu atenção é o efeito de diferentes sistemas de envasamento, representados pelos pellets, palhetas francesas e macrotubos, sobre a taxa de concepção pós-descongelamento. Os resultados apontam as palhetas francesas como as que oferecem melhores condições para a sobrevivência espermática.

De acordo com Jasko (1994), as palhetas, por apresentarem um menor diâmetro, proporcionam um congelamento e um descongelamento mais homogêneos, resultando em melhores valores dos parâmetros espermáticos.

O volume de uma amostra e a fração de superfície área/volume afeta a sua taxa de congelamento. Amostras grandes irão congelar mais lentamente do que amostras pequenas, quando expostas a uma mesma faixa de temperatura. Da mesma maneira, amostras com grandes superfícies em relação ao volume irão congelar mais uniformemente do que amostras com frações menores. As células que estão na superfície da amostra irão resfriar a uma taxa mais rápida do que as células no interior, e em amostras com grandes volumes a disparidade entre as taxas de resfriamento entre superfície e interior são bem maiores (GRAHAM, 1996).

Após o resfriamento, o sêmen deve ser envasado e submetido ao congelamento rápido. Com a utilização de palheta de 0,50ml, o sêmen envasado e resfriado deve permanecer durante 10 minutos sob vapor de nitrogênio líquido, caso as palhetas sejam de 5ml (macrotubos), o tempo recomendado é de 20 minutos. Após este prazo de equilíbrio, as palhetas são mergulhadas no nitrogênio líquido e estocadas em botijões de sêmen (JASKO, 1994).

Papa e Dell'Aqua Junior (2001) testaram as palhetas de 0,25ml para acondicionar o sêmen durante o processo de congelamento. Esses autores observaram que esse tipo de envase foi ligeiramente superior quando comparado às palhetas de 0,50ml na habilidade de preservar o sêmen.

Segundo Graham (1996b), garanhões problemas que não congelam satisfatoriamente devem ter o sêmen congelado em palhetas pequenas de 0,50 ou 0,25ml, no intuito de promover uma curva de congelamento mais uniforme para todos os espermatozoides dentro da palheta, ocorrendo maior recuperação espermática durante o processo, sendo este, portanto, o tipo de envase de escolha para determinados garanhões.

A congelamento em palhetas de 0,50ml mostrou resultados superiores aos macrotubos de 5,00ml, porém vários ganhões não mostram diferenças na motilidade espermática pós-descongelamento acondicionados em diferentes palhetas (JASKO, 1994).

A avaliação comparativa de diferentes sistemas de envase como pellets, palhetas francesas e macrotubos foram realizadas por Papa et al. (1991) e Graham (1996), que observaram uma tendência de se obter melhores resultados com o uso de palhetas francesas de 0,50ml.

2.8 DESCONGELAMENTO

Segundo Furst et al. (2008), o descongelamento é um dos pontos mais importantes do manuseio do sêmen congelado, pois diferentes fatores físico-químicos desconhecidos podem atuar influenciando na sobrevivência dos espermatozoides.

Alguns fatores influenciam o descongelamento, dentre eles as características do tipo de envasamento quanto à condutividade do calor e quanto à espessura da parede e a temperatura da água do banho-maria (AMANN e PICKETT 1987). De acordo com Cochran et al., (1984), o descongelamento pode ser de diferentes maneiras, dependendo do envasamento e do processo de congelamento propriamente dito.

Segundo Vidament et al. (2001), se o resfriamento é rápido e tiver induzido a formação de cristalização intracelular, o descongelamento deve ser bem rápido para reduzir a possibilidade de recristalização (formação de grandes cristais intracelulares durante o descongelamento). Quando o sêmen congelado for envasado em palhetas de 0,50ml e descongelado a 65° ou 75° C ao invés de 37°C (temperatura usual), resultados inconsistentes foram obtidos.

A partir de então, o sêmen de ganhão tem sido preferencialmente envasado em palhetas de 0,50ml por apresentar melhores resultados, devendo

ser descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos (COCHRAN et al., 1984; CRISTANELLI et al., 1985; AMANN e PICKETT, 1987).

Taxas mais rápidas de congelamento ocorrem em palhetas de 0,25ml do que nas de 0,50ml afetando a recuperação dos espermatozóides no descongelamento (CLULOW et al., 2007).

De acordo com estudo realizado por Dell Aqua Jr (2000), os melhores resultados pós-descongelamento foram obtidos quando se utilizou a temperatura de 65°C por 6 segundos, tanto de palhetas de 0,25 ml como para as de 0,50ml, entretanto, em relação ao macrotubo a temperatura de 46°C foi a mais indicada.

Durante o descongelamento, as células espermáticas congeladas podem sofrer danos físicos devido à recristalização, processo este ocorrido quando cristais microscópicos de gelo formam outros cristais maiores (WATSON, 1995).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido em três criatórios da raça Mangalarga Marchador localizados na cidade do Rio de Janeiro, RJ. Estes haras são destinados à criação de animais para exposição. O período experimental compreendeu os meses de setembro de 2008 a março de 2009.

As análises do sêmen pós descongelamento foram realizadas no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – da Universidade Estadual de São Paulo (Unesp) – Botucatu, SP nos meses de maio e julho de 2009.

3.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 12 garanhões da raça Mangalarga Marchador, clinicamente saudáveis, com idade variando entre 4 e 22 anos ($8,18 \pm 5,13$). Estes animais recebiam o mesmo manejo nutricional e eram mantidos em baias.

Antes da avaliação dos reprodutores, foi realizado o esgotamento das reservas espermáticas extragonadaárias dos animais, para tal, foram realizadas coletas diárias de sêmen por três dias alternados. Antes do início das colheitas para o congelamento, os animais foram submetidos a um exame andrológico, no qual somente os que apresentaram características espermáticas dentro dos padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998), foram mantidos no experimento. Além destes critérios, foi estabelecida uma padronização, na qual os animais que apresentaram motilidade total do sêmen fresco menor que 60% e concentração de espermatozoides viáveis total

no ejaculado menor que $1,8 \times 10^9$ foram descartados do estudo. Em seguida, cada reprodutor foi submetido a duas colheitas de sêmen, as quais foram realizadas em dias alternados, totalizando 24 ejaculados congelados.

3.3 COLHEITA DO SÊMEN

As colheitas do sêmen foram realizadas com o auxílio de uma vagina artificial (modelo Biotech Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil) usando a metodologia de colheita fechada, com a temperatura da vagina artificial em torno de 42°C, utilizando uma égua em estro natural devidamente contida como manequim.

Durante a monta, foram avaliados parâmetros como tempo de reação, tempo para monta, tempo de monta e número de tentativas de montas de acordo com Silva Filho (1994). Os dados foram anotados em fichas individuais (Anexo 8.1).

3.4 MANIPULAÇÃO E AVALIAÇÃO INICIAL DO SÊMEN À FRESCO

Imediatamente após a colheita, os ejaculados foram levados ao laboratório no próprio haras onde se encontrava o reprodutor. Em seguida o ejaculado foi filtrado, com o objetivo de separar a fração gel, e para tal, foi utilizado um filtro de nylon próprio. O volume foi mensurado com o auxílio de uma proveta graduada aquecida a 37°C. Após, iniciou-se a avaliação macroscópica do sêmen que se constitui pela avaliação da cor, aspecto, odor e volume. A avaliação microscópica constituiu-se de: motilidade total (%), vigor (0-5), concentração espermática (número de sptz/ml, número de sptz total e número de sptz viáveis no ejaculado). Todas as informações obtidas foram anotadas em fichas individuais (Anexo 8.1).

A motilidade total e vigor foram avaliados através de microscopia óptica no aumento de 200x, utilizando-se lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C em mesa aquecedora.

A concentração espermática foi realizada através da diluição de 1:100 (10µL de sêmen em 990µL de água destilada) utilizando uma câmara de Neubauer em microscopia óptica com aumento de 400x. A contagem foi validada quando a diferença no número de espermatozóides contados em cada retículo da câmara não ultrapassou 10%. Desta forma, foi obtida a concentração de espermatozóide em cada ml do ejaculado. Em seguida, o valor determinado foi multiplicado pela motilidade e pelo volume do ejaculado, a fim de se determinar o número de espermatozóides viáveis no ejaculado.

3.5 PROCESSAMENTO DO SÊMEN PARA CONGELAMENTO

Após a realização da concentração espermática, somente foi utilizado para o estudo o volume de sêmen que continha a concentração de $1,8 \times 10^9$ de espermatozóides viáveis, sendo o restante desprezado.

O ejaculado foi diluído em meio de centrifugação à base de leite desnatado (Botu-sêmen[®] - Biotech Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil) na proporção de 1:1 (uma parte de sêmen para uma parte de diluidor). Em seguida, este foi avaliado quanto a motilidade e vigor espermático em microscopia óptica no aumento de 200x. Posteriormente, o volume total foi fracionado em três partes iguais e distribuídos em tubos plásticos com fundo cônico de 15 ml e em seguida centrifugados a 600xg por 10 minutos em macrocentrífuga (Centrífuga de Bancada Baby[®] I Modelo 206 BL – Fanem[®], São Paulo, SP, Brasil).

3.6 ADIÇÃO DOS DILUIDORES DE CONGELAMENTO

Foi estabelecida uma taxa de diluição de 1ml de diluidor de congelamento para 100 milhões de células espermáticas viáveis, assim, sendo adicionado 6ml de diluidor de congelamento a ser avaliado em cada tubo após a realização da centrifugação, já que do total de células espermáticas separadas inicialmente do ejaculado (1,8 bilhões de espermatozóides viáveis), foram divididas em três tubos, permanecendo assim 600 milhões de células viáveis em cada tubo.

Desta forma, a concentração espermática no interior da palheta de 0,50ml foi de 50 milhões de espermatozóides viáveis e na palheta de 0,25ml de 25 milhões de espermatozóides viáveis.

Após centrifugação, desprezou-se o sobrenadante (plasma seminal mais o diluente de centrifugação) e foi feita a ressuspensão do pellet (parte concentrada dos espermatozóides) com os diluidores de congelamento de acordo com cada grupo experimental.

Foram utilizados os seguintes diluidores de congelamento: INRA 82[®] (FR4 Nutricell Nutrientes Celulares[®], Campinas, SP, Brasil, adicionado a 4% de glicerol); Botucio[®] (Biotech Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil), e, Merck Gema adicionado a 4% de glicerol. As composições e as fórmulas dos ingredientes utilizados na confecção dos diluidores encontram-se no Anexo 8.2.

3.7 ENVASE

Após a diluição com o diluidor de congelamento, foi realizado o envase do sêmen em palhetas francesas (IMV Technologies, França) de 0,25 e 0,50ml, previamente identificadas de acordo com cada grupo experimental. Foram envasadas e congeladas no mínimo seis palhetas por tratamento. Estas foram lacradas com seladora própria (Imap Seladoras, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

3.8 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Como dito anteriormente, após a centrifugação o sêmen foi ressuspendido em três diluidores (INRA 82[®], Botucrio[®] e Merck Gema) e envasado em dois tipos de palhetas (palhetas de 0,50 e 0,25ml), assim foram formados os seguintes grupos experimentais descritos na tabela a seguir:

Tabela 1: Grupos experimentais

Diluidores/Tipos de envase	Palheta de 0,25ml	Palheta de 0,50ml
INRA 82 [®]	G _{INRA+0,25}	G _{INRA+0,50}
Botucrio [®]	G _{Botucrio+0,25}	G _{Botucrio+0,50}
Merck Gema	G _{Merck Gema+0,25}	G _{Merck Gema+0,25}

3.9 CONGELAMENTO DAS PALHETAS

As palhetas do G_{INRA+0,25} , G_{INRA+0,50} , G_{Botucrio+0,25} e G_{Botucrio+0,50} foram colocadas no interior de um container de resfriamento de sêmen (Botutainer[®] - Biotech Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brasil). O container já se encontrava a uma temperatura interna de 5°C. As palhetas do G_{INRA+0,25} , G_{INRA+0,50} foram mantidas na temperatura de 5°C por 60 minutos, já as do G_{Botucrio+0,25} e G_{Botucrio+0,50} por 20 minutos.

As palhetas do G_{Merck Gema+0,25} e G_{Merck Gema+0,50} foram submetidas a uma curva rápida, ou seja, sem resfriamento prévio, sendo colocadas diretamente após diluição e envase, a uma altura de 4 cm acima do nível de nitrogênio líquido, acondicionado em caixa isotérmica, por 20 minutos, para então serem mergulhadas e em seguida armazenadas em botijão criobiológico.

Após o resfriamento e os respectivos tempos de cada tratamento experimental, as palhetas foram retiradas do container e colocadas sob vapor de nitrogênio, conforme citado anteriormente. Posteriormente, foram mergulhadas no nitrogênio líquido (- 196°C) e então acondicionadas em raques

devidamente identificadas de acordo com a codificação e partida de cada garanhão e armazenadas em botijões criobiológicos.

3.10 DESCONGELAMENTO E AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

As análises pós-descongelamento foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp-Botucatu nos meses de maio e julho de 2009.

O descongelamento das amostras foi realizado em banho-maria utilizando-se a temperatura de 46°C por um período de 20 segundos de acordo com Dell Aqua Jr (2000) e posteriormente mantidas aquecidas a 37°C na mesa aquecedora.

Duas palhetas de cada partida foram descongeladas, sendo realizada uma análise computadorizada, com o equipamento Hamilton Thorne® (IVOS-10 Sperm Analyzer, Hamilton Thorne Biosciences Inc, Beverly, MA, USA) para avaliação das seguintes variáveis espermáticas: motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP μ m/s), velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem no primeiro ponto analisado e final no último (VSL μ m/s), velocidade espermática ao longo da trajetoria real (VCL μ m/s), percentual de espermatozoides rápidos (RAPID%), médios (MEDIUM%), lentos (SLOW%) e estáticos (STATIC%). Todas as informações obtidas foram anotadas em fichas individuais conforme consta no anexo 8.4. O ajuste do HTMA – IVOS -10 está apresentado no anexo 8.3.

Para tal, uma alíquota de sêmen foi depositada na câmara de Makler (Makler Counting Chamber®, Lexington, KY, USA), previamente aquecida a 38°C, tendo sido analisados três campos aleatoriamente por amostra.

Para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal do espermatozoide, foram utilizadas sondas fluorescentes como o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio -IP (28,707-5 - Sigma),

através da técnica descrita por Harrison e Vickers (1990), modificada por Zúccari (1998).

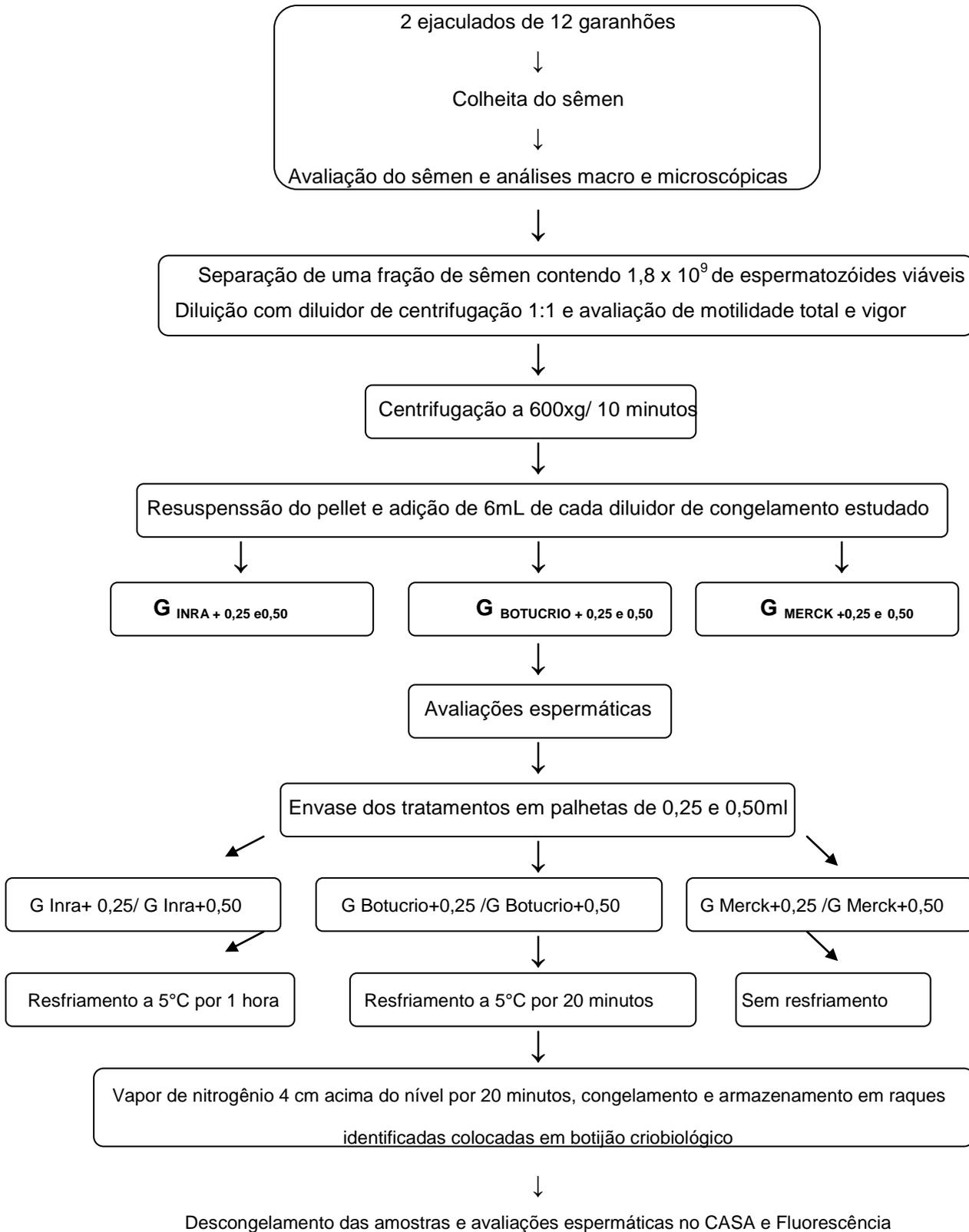
Após a análise computadorizada, uma alíquota de sêmen descongelado de 10 µl foi diluída em 40 µl de solução de trabalho contendo iodeto de propídeo e diacetato de carboxifluoresceína (Anexo 8.5 e 8.6). A avaliação foi realizada com auxílio de um microscópio de epifluorescência (Leica, DMIRB, Aotec Instrumentos Científicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil), com filtro WB e WG sob aumento de 400x.

Foram contadas 200 células em uma mesma lâmina e classificadas como íntegras e lesadas de acordo com sua coloração (Cunha, 1998), onde os espermatozóides íntegros foram considerados como aqueles corados em verde em toda a sua extensão. Já os lesados, foram considerados como aqueles que apresentaram coloração vermelha ou parcialmente corados em vermelho. Os valores foram expressos em porcentagem (%).

3.11. CLASSIFICAÇÃO DOS GARANHÕES QUANTO A CONGELABILIDADE

Os garanhões estudados foram classificados quanto a congelabilidade do sêmen baseado nos parâmetros de motilidade total e progressiva (%) com os diluidores estudados realizada nas análises pós-descongelamento. Garanhões que apresentassem motilidade total média nos diferentes diluidores avaliados acima de 30% foram enquadrados como de congelabilidade aceitável, e, aqueles que apresentassem motilidade total abaixo de 30% foram classificados como indivíduos de congelabilidade não aceitável. Os valores foram expressos em porcentagem. Estes parâmetros foram baseados de acordo com os valores preconizados pelo CBRA (1998).

3.12 FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO



3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no Laboratório de Genética Quantitativa e Melhoramento Animal do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Para o processamento das análises, utilizou-se o programa SAS.

Para as variáveis referentes ao comportamento sexual e parâmetros andrológicos foram feitas análises descritivas.

Para a realização das análises, duas subdivisões foram realizadas nos dados, sendo que na primeira divisão, temos os dados referentes às análises pré e pós-congelamento. Para as fases pré e pós-congelamento foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, na fase pré foi avaliado o efeito do diluidor de centrifugação e congelamento e na fase pós-congelamento, foi utilizado o esquema fatorial 3 x 2 (diluidor de congelamento x método de envase).

Em relação as variáveis referentes à fase pré-congelamento, o efeito do diluidor sobre a motilidade e vigor foram avaliados pela análise de variância a 5% de probabilidade. Para comparação das médias, quanto a motilidade, utilizou-se o teste Student-Newman-Keuls (SNK) e, para a análise do vigor, por se tratar de uma resposta não paramétrica, o teste Wilcoxon.

Para as variáveis pós-descongelamento, foi realizado o teste de normalidade, e para as variáveis que não apresentaram normalidade, foi realizada a transformação logarítmica (MT, MP, RAPID, MEDIUM, SLOW, STATIC, FLU INT e FLU LES). Após a transformação logarítmica, foi realizada a análise de variância a 5% e probabilidade, e para a comparação de médias foi utilizado o teste SNK (CONOVER, 1980; SNEDCOR e COCHRAN, 1980).

Para a classificação dos garanhões quanto a congelabilidade, foi realizada análise descritiva dos dados em decorrência do baixo número de repetição (garanhões).

3.14 COMITÊ DE ÉTICA

O referido experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal Fluminense em outubro de 2008 sob o número de 0044/08, estando desta forma, de acordo com os princípios Éticos na Experimentação Animal do COBEA (Anexo 8.7).

4. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho são apresentados, considerando-se dois tipos de parâmetros: parâmetros de controle e parâmetros envolvendo resultados. Os parâmetros de controle são aqueles que prestam informação sobre a homogeneidade dos grupos (garanhões) experimentais, não sendo resultados de determinado estudo. Foram avaliados, comportamento sexual durante a monta, biometria testicular e características físicas do sêmen a fresco dos garanhões estudados. Os parâmetros de resultados são: características físicas do sêmen no pré-congelamento e no pós-descongelamento, avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides e avaliação do índice de congelabilidade nos grupos experimentais estudados.

4.1 PARÂMETROS DE CONTROLE

4.1.1 Biometria testicular, Comportamento Sexual e Características Físicas do Sêmen dos Garanhões

Foram realizadas 24 colheitas de sêmen durante o experimento, estando os resultados de idade, biometria testicular, comportamento sexual dos garanhões e características físicas do sêmen fresco descritos na tabela 2.

Tabela 2. Biometria testicular, comportamento sexual e características físicas do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador utilizado no estudo.

Parâmetros	Média ± desvio padrão*	Máximo	Mínimo
Idade do Garanhão (anos)	8,18 ± 5,13 (12)	22,00	4,00
Biometria Testicular			
Comprimento do testículo direito (cm)	9,24 ± 1,46 (11)	11,30	7,00
Altura do testículo direito (cm)	8,89 ± 1,06 (11)	11,00	7,00
Largura do testículo direito (cm)	6,44 ± 0,56 (11)	7,30	5,50
Comprimento do testículo esquerdo (cm)	9,52 ± 1,25 (11)	11,50	7,20
Altura do testículo esquerdo (cm)	8,48 ± 0,67 (11)	9,20	7,00
Largura do testículo esquerdo (cm)	6,30 ± 0,60 (11)	7,50	5,00
Comportamento Sexual			
Tempo de reação (segundos)	30,39 ± 28,23 (23)	120,00	0,00
Tempo para a monta (segundos)	17,43 ± 16,68 (23)	65,00	1,00
Tempo de monta (segundos)	27,48 ± 1,54 (23)	50,00	12,00
Número de tentativas de montas	1,52 ± 0,95 (23)	5,00	1,00
Número de ejaculados	1,04 ± 0,20 (24)	2,00	1,00
Características do Sêmen Fresco			
Volume do ejaculado (ml)	44,17 ± 26,52 (24)	96,00	6,00
Motilidade total do sêmen fresco (%)	83,54 ± 8,14 (24)	95,00	70,00
Vigor do sêmen fresco (0-5)	3,63 ± 0,49 (24)	4,00	3,00
Concentração espermática por ml (x10 ⁶)	228,90 ± 136,51 (24)	460,00	24,00
Concentração espermática total (x10 ⁶)	7784,58 ± 5125,15 (24)	21226,50	1890,00
Número total de SPTZ móveis (x10 ⁶)	6414,59 ± 4023,32 (24)	18009,00	1512,00
Volume de sêmen utilizado (ml)	15,73 ± 12,24 (24)	42,00	5,00

*o número entre parêntese refere-se ao n

4.2 PARÂMETROS DE RESULTADO

4.2.1 Avaliação do sêmen fresco e diluído

Na tabela 3 estão apresentados os valores de médias e desvios padrão da motilidade e do vigor espermático pré-congelamento do sêmen a fresco, diluído com diluidor de centrifugação e com os diluidores de congelamento estudados.

Ao adicionarmos o diluidor de centrifugação ao sêmen fresco, não houve alteração ($P>0,05$) nas características seminais avaliadas. Entretanto, ao adicionar os diluidores de congelamento ao sêmen fresco, houve efeito sobre as características avaliadas, havendo queda na motilidade e vigor quando comparado com o sêmen fresco e fresco diluído ($P<0,05$). Porém, quando adicionado o diluidor INRA 82[®], essa queda foi maior em relação aos demais (Botucrio[®] e Merck Gema). Não houve diferença quanto à adição do Botucrio[®] e Merck Gema ($P>0,05$).

Tabela 3. Motilidade e vigor no pré-congelamento de sêmen fresco e diluído com diluidor de centrifugação e com diluidores de congelamento de garanhões da raça Mangalarga Marchador (média \pm desvio).

Resposta	Motilidade (%)	Vigor (0-5)
Sêmen Fresco	83,54 \pm 8,14 ^A (24)	3,63 \pm 0,49 ^A (24)
Sêmen Diluído com Diluidor de Centrifugação	86,04 \pm 6,75 ^A (24)	3,98 \pm 0,28 ^A (24)
Sêmen Diluído com INRA 82 [®]	50,00 \pm 18,9 ^C (20)	2,25 \pm 0,64 ^C (20)
Sêmen Diluído com Botucrio [®]	72,85 \pm 14,79 ^B (21)	3,30 \pm 0,85 ^B (21)
Sêmen Diluído com Merck Gema	68,57 \pm 14,41 ^B (21)	3,19 \pm 0,68 ^B (21)

^{A,B} médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem ($P<0,05$).

*o número entre parêntese refere-se ao n

4.2.2 Avaliação do sêmen pós-descongelamento

4.2.2.1 Efeito dos diluidores de congelamento e do tipo de envase

Inicialmente, ao analisarmos os dados, foi avaliada a existência de interação entre os diluidores estudados e os tipos de envase utilizados, não havendo interação entre estas respostas. Estes foram agrupados de forma a estudar separadamente o efeito dos diluidores (INRA82[®] x Botucrio[®] x Merck Gema) e do tipo de envase (palhetas de 0,25ml x palhetas de 0,50ml) sobre os diferentes parâmetros espermáticos avaliados.

Desta forma, as tabelas contendo as respostas apresentadas de forma conjunta são apresentadas no Anexo 8.8.

4.2.2.2 Efeito dos diluidores de congelamento

Os resultados de motilidade espermática total e progressiva para cada grupo estão descritos na tabela 4. Em comparações feitas entre os diluidores (INRA 82[®], Botucrio[®] e Merck Gema), observou-se que o diluidor Botucrio[®] preservou melhor ($P < 0,05$) os parâmetros de motilidade espermática do que os diluidores Merck Gema e INRA 82[®], respectivamente.

Tabela 4. Motilidade total (MT) e progressiva (MP) pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelados com os diluidores INRA 82[®], Botucrio[®] e Merck Gema avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio).

Parâmetros	G _{INRA 82}	G _{Botucrio}	G _{Merck Gema}
MT (%)	9,04 \pm 7,58 ^c (47)	41,39 \pm 16,83 ^a (48)	15,44 \pm 14,37 ^b (47)
MP (%)	3,06 \pm 3,22 ^c (47)	19,37 \pm 12,10 ^a (48)	6,57 \pm 8,35 ^b (47)

^{a,b} médias seguidas de letras diferentes na mesma linha, diferem ($P < 0,05$).

*o número entre parêntese refere-se ao n

Para os parâmetros de VAP, VSL e VCL mostrados na tabela 5, o diluidor Botucrio[®] se mostrou superior ($P < 0,05$) em relação ao Merck Gema e ao INRA82[®], porém nos parâmetros de VAP e VCL, o Merck Gema e o INRA82[®] se equipararam ($P > 0,05$). O parâmetro VSL foi o único que apresentou diferença entre os três diluidores estudados ($P < 0,05$).

Tabela 5. Velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem no primeiro ponto analisado e final no último (VSL) e velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL) no pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelados com os diluidores INRA 82[®], Botucrio[®] e Merck Gema avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio).

Parâmetros	G_{INRA 82}	G_{Botucrio}	G_{Merck Gema}
VAP ($\mu\text{m/s}$)	63,8 \pm 29,40 ^b (47)	78,87 \pm 15,66 ^a (48)	67,17 \pm 10,08 ^b (47)
VSL ($\mu\text{m/s}$)	50,31 \pm 22,27 ^b (47)	66,64 \pm 12,76 ^a (48)	60,00 \pm 8,00 ^c (47)
VCL ($\mu\text{m/s}$)	121,12 \pm 60,65 ^b (47)	150,68 \pm 24,34 ^a (48)	109,41 \pm 22,05 ^b (47)

^{a,b} médias seguidas de letras diferentes na mesma linha, diferem ($P < 0,05$).

*o número entre parêntese refere-se ao n

Na tabela 6 apresenta-se o percentual de espermatozoides rápidos, médios, lentos e estáticos no pós-descongelamento avaliados pelo sistema computadorizado. O meio diluidor Botucrio[®] obteve melhores resultados ($P < 0,05$) no percentual de espermatozoides rápidos e médios em relação aos demais diluidores. Conseqüentemente, em relação aos espermatozoides lentos e estáticos, o diluidor Merck Gema e INRA82[®] apresentaram maiores resultados sem diferir entre si ($P > 0,05$).

Tabela 6. Percentual de espermatozoides rápidos (RÁPIDOS), médios (MEDIUM), lentos (SLOW) e estáticos (STATIC) no pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelados com os diluidores INRA82, Botucrio e Merck Gema avaliados pelo sistema computadorizado (média ± desvio).

Respostas	G_{INRA 82}	G_{Botucrio}	G_{Merck Gema}
RÁPIDOS (%)	4,61±4,53 ^c (47)	25,60±16,29 ^a (48)	7,82±10,89 ^b (47)
MEDIOS (%)	4,27±3,81 ^c (47)	15,81±7,30 ^a (48)	7,48±5,44 ^b (47)
LENTOS(%)	17,04±11,61 ^b (47)	23,31±9,75 ^a (48)	17,04±17,36 ^b (47)
ESTATICOS (%)	65,51±25,41 ^a (47)	35,29±22,01 ^b (48)	67,59±25,31 ^a (47)

^{a,b} médias seguidas de letras diferentes na mesma linha, diferem (P<0,05).

*o número entre parêntese refere-se ao n

Em relação ao percentual de espermatozoides íntegros avaliados através de microscopia de epifluorescência, não se observou diferença (P>0,05) entre os diluidores estudados conforme demonstrado na tabela abaixo.

Tabela 7. Espermatozoides íntegros (%) no pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelados com os diluidores INRA 82[®], Botucrio[®] e Merck Gema avaliados pela microscopia de epifluorescência (média ± desvio).

Resposta	Íntegros (%)
INRA 82[®]	34,10 ± 16,98 (47)
BOTUCRIO[®]	33,29 ± 11,44 (48)
MERCK GEMA	33,68 ± 11,08 (47)

*o número entre parêntese refere-se ao n – (P>0,05)

4.2.2.3 Efeito do tipo de envase

Abaixo estão demonstrados os valores de MT e MP (%) do sêmen descongelado quando utilizado palhetas de 0,25 e 0,50ml, aonde não se pode observar diferença ($P>0,05$) entre estes diferentes tipos de envase.

Tabela 8. Motilidade total (MT) e progressiva (MP) pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador envasados em palhetas de 0,25 e 0,50ml avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio).

Respostas	G _{0,25 mL}	G _{0,50 mL}
MT (%)	20,17 \pm 18,95 (70)	23,9 \pm 19,90 (72)
MP (%)	9,10 \pm 11,17 (70)	10,36 \pm 11,22 (72)

*o número entre parêntese refere-se ao n - ($P>0,05$)

Os parâmetros de velocidade espermática como VAP, VSL e VCL para palhetas de 0,25 e 0,50ml respectivamente foram: 69,73; 59,18; 124,93 ($\mu\text{m/s}$) e 70,32; 58,90 e 129,48 ($\mu\text{m/s}$) demonstrando não haver diferença ($P>0,05$) entre estes tipos de envase.

Tabela 9. Velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem no primeiro ponto analisado e final no último (VSL) e velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL) no pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador envasados em palhetas de 0,25 e 0,50ml avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio).

Respostas	G _{0,25 ml}	G _{0,50 ml}
VAP ($\mu\text{m/s}$)	69,73 \pm 21,16 (70)	70,32 \pm 20,89(72)
VSL ($\mu\text{m/s}$)	59,18 \pm 16,98(70)	58,90 \pm 16,75(72)
VCL ($\mu\text{m/s}$)	124,93 \pm 43,96 (70)	129,48 \pm 42,53 (72)

*o número entre parêntese refere-se ao n - ($P>0,05$)

O percentual de espermatozoides rápidos, médios, lentos e estáticos e o percentual de espermatozoides íntegros não apresentaram diferença ($P>0,05$) entre os tipos de envase estudados, como mostram as tabelas 10 e 11 respectivamente.

Tabela 10. Percentual de espermatozoides rápidos (RAPID), médios (MEDIUM), lentos (SLOW), e estáticos (STATIC) no pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador envasados em palhetas de 0,25 e 0,50ml avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio).

Respostas	G_{0,25 ml}	G_{0,50 ml}
RAPID (%)	11,77 \pm 14,51(70)	13,75 \pm 15,18(72)
MEDIUM (%)	8,35 \pm 7,14(70)	10,09 \pm 7,77(72)
SLOW (%)	19,12 \pm 14,86(70)	19,19 \pm 12,19(72)
STATIC (%)	57,84 \pm 29,11(70)	54,18 \pm 27,61(72)

*o número entre parêntese refere-se ao n - ($P>0,05$)

Tabela 11. Espermatozoides íntegros (%) no pós-descongelamento de garanhões da raça Mangalarga Marchador envasados em palhetas de 0,25 e 0,50ml avaliados pela microscopia de epifluorescência (média \pm desvio).

Resposta	Íntegros (%)
Palheta de 0,25 ml	33,74 \pm 12,78 (70)
Palheta de 0,50 ml	33,63 \pm 13,94 (72)

*o número entre parêntese refere-se ao n - ($P>0,05$)

4.2.2.4 Avaliação do índice de congelabilidade entre garanhões

Na tabela a seguir são apresentados os resultados de congelabilidade do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador frente aos diluidores avaliados. A resposta avaliada trata-se de um estudo de dispersão de frequência, assim, ao trabalharmos com contingente reduzido, aumentamos o intervalo de confiança dos resultados percentuais, equiparando indevidamente grupos que mostram percentuais muito diferentes. Diante deste fato, resolvemos apenas realizar uma análise descritiva dos dados em decorrência do baixo número de repetição (garanhões).

Tabela 12. Congelabilidade do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelado nos diluidores INRA82, Botucrio e Merck gema.

	MT acima de 30%	MT abaixo de 30%
INRA82[®]	0/12 (0,00%)	12/12 (100,00%)
BOTUCRIO[®]	7/12 (58,33%)	5/12 (41,67%)
MERCK GEMA	1/12 (8,33%)	11/12 (91,67%)

Observa-se que todos os garanhões (100,00% - 12/12) utilizados no presente estudo apresentaram baixa congelabilidade ao utilizar o diluidor INRA82[®]. Fato semelhante ocorreu quando se utilizou o diluidor Merck Gema. Entretanto, ao utilizar o diluidor Botucrio[®], a maioria (58,33% - 7/12) dos garanhões apresentou motilidade pós-descongelamento acima de 30%.

5. DISCUSSÃO

Ao avaliarmos os resultados dos parâmetros de controle obtidos relativos à biometria testicular, comportamento sexual e parâmetros espermáticos, podemos considerar estes dentro do padrão de normalidade para a espécie segundo Jasko (1992).

Num estudo desenvolvido por Parlevliet, et al. (1994), ao trabalharem com 398 garanhões da raça Warmblood Holandês, obtiveram como médias as seguintes características seminais: volume do ejaculado sem gel ($65,00 \pm 26,00$ ml), concentração de espermatozóides por mililitro ($194,00 \pm 7,35 \times 10^6$), e motilidade progressiva ($68,0 \pm 9,00\%$), avaliados através de microscopia de fase. Em relação à biometria testicular, foram encontradas médias para o testículo esquerdo de $9,8 \pm 0,9$ cm de comprimento e $5,6 \pm 0,8$ cm de largura e para o testículo direito de $9,8 \pm 0,9$ cm de comprimento e $5,7 \pm 0,7$ cm de largura. Ao compararmos nossos resultados (características físicas seminais e biometria testicular) com os obtidos por Parlevliet, et al. (1994), observamos valores semelhantes, apesar dos garanhões serem de raças distintas.

Ainda comparando-se os dados relativos ao volume de sêmen sem gel, número de espermatozóides/ml e motilidade obtidos a partir dos garanhões utilizados neste experimento com os valores preconizados por Pickett (1993), verifica-se que as características espermáticas encontram-se dentro dos níveis aceitáveis para um garanhão aprovado para fertilidade.

Os resultados das avaliações pré-congelamento dos parâmetros de motilidade e vigor espermático, quando comparado o sêmen fresco com sêmen diluído com diluidor de centrifugação à base de leite desnatado (Botu-sêmen[®]), não mostraram diferenças ($P > 0,05$). Estes resultados estão de acordo com Dell'Aqua Jr. (2000), onde os parâmetros de motilidade total e vigor

espermático do sêmen fresco e diluído com meio Kenney não apresentaram diferenças entre si. Além disso, os valores médios de motilidade total verificados na avaliação do sêmen fresco situam-se dentro dos padrões referidos pela literatura (McKINNON e VOSS,1993).

Por outro lado, ao adicionarmos os diluidores de congelamento no sêmen após a centrifugação, observamos queda na motilidade e no vigor espermático, independente do diluidor utilizado ($P < 0,05$), sendo que essa queda foi maior ao adicionar o diluidor INRA82[®] (83,54%; 86,04%; 50,00%; 72,85%; 68,57% e 3,63; 3,98; 2,25; 3,30; 3,19), respectivamente, para o sêmen fresco, diluído com diluidor de centrifugação, INRA82[®], Botucrio[®] e Merck Gema. Não foram encontrados na literatura estudos onde foram realizadas tais comparações, ou seja, parâmetros de motilidade e vigor espermáticos no pré-congelamento e posteriormente ao adicionarmos os diluidores de congelamento. Pode-se especular que estes achados devem-se provavelmente ao fato do glicerol já apresentar efeito tóxico sobre a viabilidade espermática antes mesmo de sofrer o processo de resfriamento e também pelo fato da presença de outros componentes como a gema de ovo em concentrações mais baixas como ocorre no diluidor Inra 82 em relação aos demais diluidores, conferindo menor proteção à célula espermática.

Segundo Demick et al. (1976), o glicerol é deletério para o espermatozóide equino e causa redução na capacidade fecundante espermática mesmo na ausência de congelamento. Pace e Sullivan (1975) apresentam que a adição do glicerol tem se mostrado prejudicial quando utilizado em altas concentrações em sêmen fresco ou refrigerado. Estas informações sustentam esta queda dos parâmetros seminais ao serem adicionados os diluidores de congelamento no sêmen a fresco.

Nas avaliações pós-descongelamento, quando se estudou os efeitos dos diluidores de congelamento isoladamente, obteve-se valores de motilidade espermática (total e progressiva) superiores com o diluidor Botucrio[®] comparado aos diluidores Merck Gema e Inra 82[®] (41,39% vs 15,44% e 9,04%

respectivamente, para a motilidade total e 19,37% vs 6,57% e 3,06%), respectivamente, para motilidade progressiva). O fato do diluidor Botucrio[®] apresentar-se superior aos demais, deve-se provavelmente a diferenças na composição de suas fórmulas, levando-se em consideração a presença e concentração de diferentes crioprotetores celulares, tipos de açúcares utilizados e sistema tampão. A menor concentração de glicerol e a presença da metilformamida no diluidor Botucrio[®] promoveu uma melhor viabilidade espermática pós-descongelamento. Segundo Papa et al. (2002), este diluidor combina a associação da metilformamida a 4% e do glicerol a 1% enriquecido com açúcares e substratos de cultivo celular como fontes de macromoléculas além da presença da gema de ovo e leite desnatado.

Alvarenga et al. (2005) relataram que esta característica dos crioprotetores à base de amida, de se adaptarem melhor como agentes crioprotetores ao sêmen de garanhões que apresentam resultados insatisfatórios com o glicerol, possam estar relacionados à menor viscosidade das amidas em relação ao glicerol, resultando em uma maior permeabilidade destes crioprotetores, conseqüentemente diminuindo os riscos de estresse osmótico nas células espermáticas. A metilformamida possui um peso molecular mais baixo do que o do glicerol (59M vs 92M), provavelmente induzindo menos estresse osmótico.

Os dados encontrados por Terraciano et al. (2008) indicam que as amostras congeladas com diluente à base de amidas resultaram na obtenção de uma melhor motilidade progressiva do sêmen após o congelamento, do que quando se utilizou o diluente FR5 contendo glicerol utilizando sistema de congelamento automatizado programável. Estando, portanto de acordo com os resultados expressos no presente trabalho, apesar das diferenças metodológicas utilizadas.

Os resultados deste estudo estão de acordo com Melo et al. (2007), no qual o uso do glicerol em baixas concentrações (1%) promoveu resultados superiores na viabilidade espermática pós descongelamento quando

combinado com as amidas (4% metilformamida) ou até mesmo quando usado sozinho como crioprotetor. Entretanto, a toxicidade do glicerol foi observada quando o sêmen de garanhões que são “maus congeladores” foi congelado, sendo este efeito minimizado através da combinação do glicerol com as amidas.

Por outro lado, Graham (1996) relata que o glicerol é o crioprotetor de escolha para a criopreservação de sêmen equino. Segundo Amann e Pickett (1987), apesar de apresentar toxicidade para a célula e comprometer a fertilidade, ainda não foi encontrado um crioprotetor que o substitua com maior eficiência de crioproteção. Os resultados do presente estudo demonstram que quando a utilização do crioprotetor glicerol junto com a metilformamida no diluidor Botucrio[®], obtivemos melhores resultados de motilidade e vigor espermáticos, em comparação ao uso do glicerol sozinho nos meios diluidores Merck Gema e INRA82[®], além da presença da gema de ovo, dos açúcares e do leite desnatado em concentrações diferentes.

Squires et al. (2004) obtiveram melhores resultados de motilidade espermática pós-descongelamento com a associação da dimetilformamida com glicerol ou da dimetilformamida quando utilizada sozinha em comparação ao uso do glicerol sozinho.

Segundo Cochran et al. (1984), quando utilizaram o diluente lactose-edta-gema de ovo no congelamento, verificaram que o glicerol foi superior na concentração de 4% quando comparado a outras concentrações, estando de acordo com a concentração utilizada no presente estudo. Alvarenga et al. (2003), demonstraram que o glicerol foi o crioprotetor que induziu estresse osmótico mais marcante promovendo severas alterações nos parâmetros de motilidade, viabilidade celular e integridade acrossomal.

Os parâmetros de motilidade total e progressiva pós-descongelamento com glicerol e dimetilformamida observados por Medeiros et al. (2002) foram respectivamente: 27,00%; 8,00% e 52,00%; 12,00%. Gomes et al. (2002) também encontraram valores semelhantes sendo, 42,75% e 13,50% para

dimetilformamida e 15,56%; 5,62% para glicerol. Medeiros e Gomes ao compararem os crioprotetores glicerol e dimetilformamida observaram queda na motilidade espermática com o uso do glicerol. Neste estudo, comparando o uso do glicerol associado ou não ao uso da metilformamida, também observamos que a presença apenas do glicerol determinou a queda da motilidade espermática. Estes resultados vão de encontro aos obtidos neste experimento, que encontrou valores similares (41,4%; 19,4% para o diluidor Botucrío[®] e 9,04%; 3,0% para o diluidor INRA82[®]).

A hipótese dos crioprotetores a base de amidas possuírem uma maior permeabilidade celular e esta acarretar menos danos celulares, parece bastante plausível para elucidação dos resultados obtidos com os crioprotetores contidos nos diluidores estudados, mostrando-se superiores ao glicerol.

Terraciano et al. (2008) encontraram maior eficiência na criopreservação de sêmen equino com a utilização do diluente comercial Botucrío[®] em relação ao FR5.

Para os diversos padrões de velocidade espermática obtidos (VAP, VSL e VCL), os resultados do grupo que utilizou o diluidor Botucrío[®] mostrou-se superior aos demais. Estes resultados foram distintos dos resultados relatados por Ferreira (2008), aonde as velocidades não diferiram entre os crioprotetores estudados (glicerol a 3% e metilformamida a 3%), assim como Medeiros (2003) ao avaliar metilformamida e glicerol na concentração de 5%.

Os resultados encontrados para o percentual de espermatozoides rápidos e médios foi superior para o diluidor Botucrío[®], conseqüentemente, para o percentual de espermatozoides lentos e estáticos, os diluidores INRA82[®] e Merck gema não diferiram entre si. Os valores encontrados são semelhantes aos relatados por Vidament et al. (2005), aonde o percentual de espermatozoides rápidos foi superior no grupo que se utilizou o crioprotetor metilformamida em relação ao grupo controle e ao grupo que se utilizou o glicerol como crioprotetor. Medeiros (2003) também apresentou resultados

similares, com percentual de espermatozoides rápidos (RAPID) de 32,5% e 14,0% respectivamente para metilformamida a 5% e glicerol a 5%. Medeiros (2007), obteve um maior percentual de espermatozoides rápidos quando utilizou a metilformamida em relação aos demais.

Quanto à integridade de membrana plasmática, não foram observadas diferenças entre os diluidores avaliados, assim como Ferreira (2008), que também não observou diferença em relação ao percentual de espermatozoides íntegros nos crioprotetores metilformamida e glicerol. Da mesma forma, Alvarenga et al. (2000) também não encontraram diferenças. Porém, discordando destes resultados, Terraciano et al. (2008) encontraram um percentual de células íntegras superior com Botucio[®] quando comparado com FR5. Medeiros (2007) observou superioridade quanto à integridade de membrana com as amidas em relação ao glicerol.

Em relação ao tipo de envase do sêmen (palhetas de 0,25 e 0,50ml), não foram encontradas diferenças ($P>0,05$) nos parâmetros estudados. De acordo com Jasko (1994), as palhetas por apresentarem um menor diâmetro, proporcionam um congelamento e um descongelamento mais homogêneos, resultando em melhores valores dos parâmetros espermáticos. Estando de acordo com o trabalho, assim como os resultados referentes ao método de envase do presente trabalho concordam com as observações de Graham (1996b), sendo que este relata que garanhões que não congelam satisfatoriamente devem ter o sêmen congelado em palhetas pequenas de 0,50 ou 0,25ml, no intuito de promover uma curva de congelamento mais uniforme para todos os espermatozoides dentro da palheta, ocorrendo maior recuperação espermática durante o processo, sendo este, portanto, o tipo de envase de escolha para estes garanhões.

Os parâmetros de motilidade e velocidade espermática (VAP, VCL, VSL e STR) obtidos por Dell'Aqua Jr. (2000) das palhetas de 0,25 e 0,50ml superaram os resultados obtidos pelo macrotubo de 4ml, porém não diferiram

entre si ($P>0,05$), indo de encontro com os resultados expressos neste trabalho.

Os resultados obtidos por Dell'Aqua Jr. (2000) sugerem a utilização de palhetas de 0,25ml como sendo as mais adequadas para a realização da criopreservação, pois as palhetas de 0,50ml apresentaram resultados ligeiramente inferiores aos de 0,25ml. Entretanto, diversos autores como Delius 1985; Wocker et al.1989; Papa et al.1991 e Graham 1996, em relação ao tipo de envase do sêmen, observaram uma tendência de se obter melhores resultados com o uso de palhetas de 0,50ml.

Já Papa e Dell'Aqua Jr.(2001), ao testarem o acondicionamento do sêmen em palhetas de 0,25ml e 0,50ml, os resultados obtidos não mostraram ocorrer diferenças para os parâmetros de motilidade e vigor espermáticos, assim como os resultados deste estudo. Mas no referido estudo, palhetas de 0,25ml descongeladas a 65°C por 6 segundos apresentaram melhores resultados de integridade de membrana plasmática. Já, nos resultados de integridade de membrana plasmática comparando os métodos de envase do sêmen neste estudo, não se observou diferenças neste parâmetro ($P>0,05$).

Os resultados da avaliação do índice de congelabilidade demonstraram que todos os garanhões (100,00% - 12/12) utilizados no presente estudo apresentaram baixa congelabilidade ao utilizar o diluidor INRA82[®]. Fato semelhante ocorreu quando se utilizou o diluidor Merck Gema. Entretanto, ao utilizar o diluidor Botucio[®], a maioria (58,33% - 7/12) dos garanhões apresentou motilidade pós-descongelamento acima de 30%.

Os animais utilizados neste experimento, segundo classificação estabelecida pelo Colégio Brasileiro e Reprodução Animal – CBRA (1998) para características espermáticas nos equinos, apresentam menos de 30% de motilidade progressiva pós-descongelamento, portanto são classificados como animais com sêmen de baixa congelabilidade. Já segundo classificação de Brinsko et al. (2000), garanhões que apresentem menos de 25% de motilidade

progressiva pós-descongelamento podem ser classificados como animais com sêmen de baixa congelabilidade.

Em relação ao parâmetro de motilidade, os resultados encontrados estão de acordo com Gomes et al. (2002) aonde a maioria dos garanhões da raça Mangalarga Marchador apresentaram motilidade total abaixo de 30% após terem o sêmen descongelado com glicerol.

Em estudo de Alvarenga et al. (2003), o percentual de garanhões com motilidade pós-descongelamento superior a 40% foi de 38% (21/55) para o sêmen congelado com glicerol e 80% (44/55) para os animais com a dimetilformamida. Da mesma forma, experimentos em diferentes espécies compararam soluções crioprotetoras com amidas e glicerol, evidenciando superioridade das soluções compostas por amidas (HANADA e Nagase, 1980; TSELUTIN et al., 1995). Esta superioridade pode estar relacionada ao seu suposto mecanismo de ação e baixo peso molecular, quando comparado ao glicerol, produzindo menor agressão osmótica à célula espermática.

A explicação para a maioria dos garanhões utilizados neste estudo apresentarem um padrão de congelabilidade ruim, refere-se ao fato dos garanhões escolhidos para este experimento serem da raça Mangalarga Marchador.

Segundo estudo de Gomes et al. (2002), ficou claramente demonstrado que, em geral, garanhões da raça Mangalarga Marchador são considerados maus congeladores, pois somente 2 dos 17 garanhões estudados, mostraram boa qualidade seminal após serem congelado/descongelado com glicerol. Em estudo de Medeiros (2007), foi observado que 12 (27) animais da raça Mangalarga Marchador, isto é, 45% foram enquadrados no grupo de congelabilidade não aceitável em relação aos resultados pós-descongelamento, dos 27 garanhões avaliados no experimento.

Alguns autores relatam que diluentes contendo amidas em sua formulação produzem melhores resultados quanto à preservação de sêmen de equinos que não apresentam bons índices ao congelamento com diluentes

contendo altas concentrações de glicerol (Gomes et al., 2002; Alvarenga et al., 2005). Gomes et al. (2002) consideram que em algumas raças e indivíduos, os efeitos deletérios do glicerol se tornam mais acentuados.

De acordo com Gomes et al. (2002) a utilização das amidas em ganhões com sêmen de boa congelabilidade não proporciona aumento na motilidade e sim resultados similares quando utilizado o glicerol, entretanto, em ganhões que apresentam baixa resistência ao processo de criopreservação, manifesta melhores resultados quando comparados ao glicerol.

Holt (2000) em sua revisão afirmou existirem diferenças na composição lipídica da membrana plasmática entre espécies, raças e ainda entre indivíduos da mesma espécie, sendo talvez, a explicação para que um mesmo meio diluente confira maior ou menor proteção aos espermatozoides de um determinado indivíduo. Silva et al. (1987) consideraram os ganhões como “bons congeladores” e “maus congeladores”, e estas duas classes se diferenciam pela capacidade das células espermáticas tolerarem os efeitos deletérios da criopreservação.

Um dos fatores envolvidos na sensibilidade destes indivíduos classificados como de baixa congelabilidade no presente estudo e os citados por outros autores, podem estar relacionados às características físico-químicas do glicerol, no que se refere à viscosidade e peso molecular. Sabe-se que o sêmen de um ganhão pode responder diferentemente a criopreservação dependendo do tipo de diluidor utilizado (Graham, 1996). E também, esta variabilidade de resposta ao congelamento apresentada pelo espermatozoide equino pode ser devido à menor proporção colesterol:fosfolípideo presente em sua membrana plasmática entre outras causas ainda não esclarecidas (PARKS e LYNCH, 1992). A variação na fluidez de membrana plasmática pode ser uma explicação para esta variabilidade na congelabilidade de sêmen observada entre ganhões individuais.

No entanto, a utilização desses agentes em garanhões com baixa resistência ao processo de criopreservação, manifesta melhores resultados quando comparados com o glicerol (GOMES et al., 2002).

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste experimento permite-se concluir que:

1. Os diluidores Inra82 e Merck gema acrescidos de 4% de glicerol se mostraram desfavoráveis para serem utilizados na criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. Entretanto, o diluidor Botucrio foi o mais eficiente em preservar os parâmetros espermáticos avaliados.
2. Animais com sêmen de baixa congelabilidade têm seus resultados melhorados com a utilização do diluidor Botucrio.
3. Não ocorrem diferenças na qualidade espermática do sêmen quando envasados com palhetas de 0,25 e 0,50ml quando da utilização da taxa de diluição de 100 milhões de espermatozoides viáveis por mililitro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

AITKEN,R.J. **Free radicals, lipid peroxidation and sperm function.** Reprod. Fertil. Dev.7(4);p.659-668,1995.

ALMEIDA,J.L. **Efeitos de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação de semen equino.** 2006, 77p. Dissertação (Mestrado), Universidade de Brasília- Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinaria, 2006.

ALVARENGA,M.A.;PAPA,F.O;BURATINI JUNIOR,J. **The effect of breed and spermatic parameters over equine semen freezability.** In: SYMPOSIUM OF STALLION SEMEN,1996, Amersfort, Proceedings...,Amersfort,p.82,1996

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

ALVARENGA,M.A. **The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen.** In: Workshop on transporring gametes and embryos, Havemeyers Foundation,2003. Proceedings,p.74-76,2003.

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

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

AMANN,R.P;GRAHAM,J.K. **Spermatozoal function.**In: Mc Kinnon,AO,Voss JL. Equine Reproduction. Pennsylvania: Lea & Febiger,cap.80,p.715-745,1993.

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

ARRUDA,R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).** Tese (livre docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de SP, Botucatu,2000.

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

BALL,B.A;GRAVANCE,C.G;MEDINA,V.;BAUMBER.J.;LIU,I.K.**Catalase activity in equine semen.** Am J Vet Res.2000:61(9);1026-1030,2000.

BALL,B.A.; VO,A.T. **Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potencial.** J. Androl., v.22(6),p.1061-1069,2001.

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

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.

CLULOW,J.R.;MAXWELL,WMC.;EVANS,G.;MORRIS,LHA. **A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm.** Australian vet. Journal (Equine),v.85,n.6,p.232-235,2007.

COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P. et al. **Effects of centrifugation, glycerol level cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm.** Theriogenology, v.2, p.25-28, 1984.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual de exame andrológico e avaliação de semen animal.** 2 ed. Belo Horizonte, CBRA,49p., 1998.

CONOVER, W. J. **Practical nonparametric statistics.** New York: Wiley, 1980, 493p.

COOPER,G.M. **The cell: a molecular approach.** 1 ed, ASN Press: Washington,673p,1996.

COTTORELLO,A.C.P. **Criopreservação de sêmen equino utilizando associação de etilenoglicol e glicerol.** 2002. 47p, Dissertação Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2002.

CRABO,BO,G. **Physiological aspects of stallion semen cryopreservation.** In: IN DEPTH: REPRODUCTION – THE USE OF FROZEN SEMEN, In: AAEP PROCEEDINGS,V.47,2001.

CRISTANELLI,M.J.;AMANN,R.P.;SQUIRES,E.L.;PICKETT,B.W. **Effect of egg yolk and glycerol levels in lactose – EDTA- egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa.** Theriogenology,v.24,p.681-686,1985.

CROWE,J.A.;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 acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose.** Theriogenology. v. 49. p.831-41. 1997.

DE LAMIRANDE,E; GAGNON,C. **The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function.** In: Gagnon, C (ed) , The Male Gamete: From basic Science to Clinical application. Vienna, IL: Cache River Press, p.445-476,1999.

DELL'AQUA JR,J.A. **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado equino.** 2000, Dissertação(Mestrado),

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2000.

DE LEEUW,F.E.; DE LEEUW,A.M.; DENDAAS,J.H.G.; COLENBRANDER,B.; VERKLEIJ,A.J.;**Effects of various crioprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing.** Cryobiology,v.24,p.324-331,1993.

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

DOCHI,O.;IMAI,K.;TAKAKURA,H. **Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stores frozen in ethylene glycol.** Anim. Reprod. Science,v.38,n.3,p.179-185,1995.

DOEBBLER,G.F. **Cryoprotective compounds- review and discussion of structure and fuction.** Cryobiology,v.4,p.2-11,1966.

FASTARD,W. **Semen cryopreservation of dog and foxes.** An. Repr. Sci.,v.12,p.145-150,1996.

FERREIRA,H.N. **Efeito da exposição aos crioprotetores glicerol e metilformamida sobre a viabilidade e fertilidade do sêmen equino.**2008.Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2008.

FERREIRA,J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento pós descongelamento do sêmen equino.**2000. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2000.

FLESH,F.M;GADELLA,B.M. **Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization.** Biochemica et Biophysica Acta, n.1469, p.197-235,2000.

FOULKES,J.A. **The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa.** J. reprod.Fertil., v.49, p.277-284,1977.

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

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

GARNER,D.L.;HAFEZ,E.S.E. **Espermatozóides e plasma seminal.** In: HAFEZ, E.S.E. (Ed). Reprodução Animal.6 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda,1995,p.175-190.

GILMORE, J.A.; MCGANN, L.E.; LIU, J.; GAO, D.Y.; PETER, A.T.; KLIENHANS, F.W.; CRITSER, J.K. **Effect of crioprotectants solutes on**

water permeability of human spermatozoa, Biology Reproduction, v.53, p.985-95, 1995.

GILMORE, J.A.; LIV, J.; GAO, D.Y et al. **Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa**. Human Reproduction, v.12, p.112-118, 1997.

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

GORDON, I. **Embryo Transfer in cattle. In: Controlled reproduction in cattle and buffaloes**. Dublin: CAB International, p.245-344, 1996.

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

GRAHAM, J.K. **Cryopreservation of stallion spermatozoa**. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, v.12, n.1, p.131-147, 1996b.

GRAHAM, J.K. **Sperm physiology: response to freezing and analysis of sperm function**. ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1996, Proceedings. Society for Theriogenology, p.54-59, 1998.

HAFEZ, E.S.E. (Ed). **Reprodução Animal**. 6 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1995, 582p.

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

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

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

HOCHACHKA,P.W. **Defense strategies against hypoxia and hypothermia.** Science, v.231, p.234-241, 1986.

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

JASKO,D.J. **Evaluation of equine semen.** Veterinary Clinic of North America - Equine Practice, v.8, p.129-148, 1992.

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

JOHNSON,M.H. **The macromolecular organization of membranes and its bearing on events leading up to fertilization.** J Reprod. Fertil., v.44, n.1, p.167-184, 1975.

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

KUNDU,C.N.;CHAKRABORTLY,J.;DUTRA,P.;BHATTACHARYYA,D.;GHOSH, A.;MAJUMDER,G.C. **Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium ad goat cauda epididimal spermatozoa**. Cryobiology, v.40, p.117-125, 2000.

LANDIM- ALVARENGA,F.C.;MEDEIROS,A.S.L.;PAPA,F.O.;ALVARENGA,M.A. **Evaluation of acrossomal integrity of stallion cryopreserved with amides and glycerol**. Animal Reproduction Science, v.89, p.288-291, 2005.

LEIBO,S.P.;BRADLEY,L. **Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa**. In: GAGNON,C.(ed). The Male Gamet: from Basic science to clinical application. Vienna: Cache River Press, p.501-516, 1999.

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

MAZUR,P. Cryobiology: **The freezing of biological systems**. Science 1970:168 (934);939-949.

MC KINNON, A.O, VOSS, J.L. **Equine Reproduction**: Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1.137p, 1993.

MC KINNON, A.O. **Artificial Insemination of cooled, transported and frozen semen**. Austr. Equ. Vet Journal, v.14, n.4, p.156-175, 1996.

MEDEIROS,A.S.L. **Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade do semen de garanhões frente a diferentes crioprotetores.** 2007, tese(doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2007.

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

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

MELO, C.M. **Efeitos de diferentes diluentes de centrifugação e crioprotetores na congelação de semen equino.**In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Anais..., v.16, p185, Goiânia, GO, 2005 (Resumos).

MELO,C.M.;ZAHN,F.S.;MARTIN,I.;ORLANDI,C.;DELL'AQUAJR,J.A.;ALVARENGA,M.A.;PAPA,F.O. **Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa.** Journal of equine veterinary Science, v.27, n.4, p.171-175, 2007.

MERCADANTE,C.F.J.;ARRUDA,R.P.;NEVES NETO,J.R. et al. **Congelamento de sêmen equino em etilenoglicol ou glicerol: motilidade, vigor e teste de termorresistência – estudos preliminares.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1995. Anais... Belo Horizonte; Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, p.290, 1995.

MOFFET,P.D.;BRUEMMER,J.E.;CARD,C.;SQUIRES,E.L. **Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa.** Proceedings society for theriogenology , annual conference, p.42, 2003.

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

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.

NASH,T. **Chemical constitution and physical properties of compound able to protect living cells against damage due to freezing and thawing.** Cryobiology, New York, p.179-220, 1966.

PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J. **Effect of insemination,number of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen.** J. Reprod. Fertil. Suppl., v.23, p.115-121, 1975.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A . **Influência de diferentes substâncias como pós-diluentes sobre a motilidade de sêmen congelado de equino em teste de resistência térmica a 38°C.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 29, 1984, Belém. *Anais...* Belém: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1984.

PAPA,F.O.;CAMPOS FILHO,E.P.;ALVARENGA,M.A.;BICUDO,S.P.;MEIRA,C. **Influência da forma de acondicionamento sobre a integridade**

acrossômica e termo resistência de sêmen congelado de equino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL,9,1991, Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.456, 1991.

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

PAPA,F.O.;ZAHN,F.S.;DELL`AQUA,J.A.;ALVARENGA,M.A. **Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen equino.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.26, p.3, 2002.

PAPA, F.O.; MELO, C.M.; DELL AQUA, J.A.; MACEDO, L.P.; CARVALHO, A.G.; ALVARENGA, M.A.; MEDEIROS,A.S.L. **Inovações Metodológicas na biotecnologia de refrigeração e congelamento de sêmen eqüino.** Acta Scientiae Veterinariae, v.33 (supl 1), p. 19-27, 2005.

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

PARKS,J.E; LYNCH,D.V. **Lipid composition and thermotrófic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membrane.** Cryobiology, v.29, n.2, p.255-266, 1992.

PARLEVLIIET,J.M; KEMP,B.; COLENBRANDER,B. **Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood Stallions.** Journal of Reproduction and Fertility, v.101, p.183-187, 1994.

PICKETT,B.W.;AMANN,R.P. **Extension and storage of stallion spermatozoa: a review.** J. Equine Vet. Sci., v.7, p.289-302, 1987.

PICKETT,B.W.;AMANN,R.P. **Cryopreservation of semen.** In: Mc KINNON, A.O: VOSS,J.L (ed).Equine Reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger, p.769-789, 1993.

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

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

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

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

SANTOS,O.E.C. **Viabilidade in vitro do sêmen de cão submetido a congelamento com diferentes diluidores e crioprotetores.** Belo Horizonte, MG: UFMG, 60f. Dissertação (mestrado em medicina veterinária) – Escola de veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2003.

SAS/STAT. **User's Guide**, 6.12 ed. SAS Institute, Cary, NC, 1996

SILVA,A.R.;CARDOSO,R.C.S;UCHOA,D.C.;SILVA,L.D.M. **Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addiction during the freezing process.** Theriogenology, v.59, p.821-829, 2003.

SILVA,SS;HENRY,M;NUNES,SA et al. **Influência do sistema de envasamento sobre a qualidade espermática de jumentos (*Equus asinus*) avaliada “in vitro” pós-descongelamento.** Rev. Bras. Reprod. Anim., v.21, p.140-146, 1997.

SILVA FILHO,J.M. **Diferentes aspectos da IA em equinos: efeitos da palpação retal, da frequência de inseminações , de diluidores, do resfriamento e do transporte do sêmen sobre a fertilidade de éguas inseminadas.** Viçosa: faculdade de Zootecnia, UFV, tese Doutorado, 497p, 1994.

SNEDCOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods.** Ames: Iowa State Universty, 505 p., 1980.

SNOECK,P.P.N.;HENRY,M.;MELO,M.I.V. **Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós descongelamento de sêmen equino.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.59, n.1, p.56-64, 2007.

SQUIRES,E.L.;KEITH,S.L.;GRAHAM,J.K. **Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa.** Theriogenology, v.62, p.1056-1065, 2004.

STOREY,B.T.;NOILES,E.E.;THOMPSON,K.A. **Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide defined cryoprotectants medium for mouse spermatozoa cryopreservation.** Cryobiology, v.37, p.46-58, 1998.

STRYER,L. Biochemistry. 3 ed.New York:W.H.Freeman,1988. **Introduction to biological membranes:** p.283-310.

TERRACIANO,P.B; BUSTAMANTEFILHO,I.C.; MIQUELITO,L.V.; ARLAS,T.R.; CASTRO,F.; MATTOS,R.C.; PASSOS,E.P.; OBERST,E.R.; LIMA,E.O.C **Criopreservação de espermatozóides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial.** Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.7, p.1972-1977, 2008.

TISCHENER,M. **Evaluation of deep- frozen semen in stallions.** J. Reprod. Fertil. Suppl, v.27,p.53-54,1979.

VALLE, G.R.; SILVA FILHO, J.M. **Membrana plasmática do espermatozóide.** Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia, n.36, p45-53, 2001.

VIDAMENT,M.;DUPERE,A.M.;JULIENNE,P.;EVANS,A.;MOUE,P.;PALMER,E. **Equine frozen semen freezability and fertility field results.** Theriogenology, v.48, p.907-917, 1997.

VIDAMENT,M,; YVON,J.M.; COUTY,I.; ARNAUD,G.; NGUEKAMFEUGANG,J,; NOUE,P,; COTTRON,S,; LETELLIER, A,; NOEL,F,; PALMER,E,; MAGISTRINI,M. **Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82.** Animal reproduction Science, v.68, p.201-218, 2001.

VIDAMENT, M.; ECOT,P,; NOUE, P,; BOURGEOIS, C,; MAGISTRINI, M,; ALMER, E. **Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post thaw motility and fertility of stallion spermatozoa.** *Theriogenology*, v. 54, p. 907- 919, 2002.

VIDAMENT,M,; VINCENT,P,; YVON,J.M,; BRUNEAU,B,; MAR,F.X. **Glycerol in semen extender is a limiting factor in the fertility in asine and equine species.** Animal reproduction Science, v.89, p.302-305, 2005.

WATSON,P.F. **The preservation of semen in mammals.** Oxford Rev. Reprod.Biol., v.1, p.183-350, 1979.

WATSON,P.F. **The effects of cold shock on sperm cell membrane.** In: MORRIS,G.J & CLARKE,A. Effects of low temperature on biological membranes. Academic Press, New York, p.189-218, 1981.

WATSON, P. F. **Artificial Insemination and the preservation of semen.**In: LAMMING,G.E. Marshall's physiology of reproduction, 4 ed. London, p.747-835, 1990

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

WATSON,P.F. **The cause of reduced fertility with cryopreserved semen.** Animal Reproduction Science: v.60-61, p.481-492, 2000.

WOLFE,J.;BRYANT,G. **Cellular Cryobiology: thermodynamic and mechanical effects.** International Journal of Refrigeration, v.24, p.436-450, 2001.

YANAGUIMACHI, R. In: E. KNOBIL,J.D.NEILL (Eds), **The physiology of reproduction**, Raven Press, New York, p.189-317,1994.

YILDIZ,C.;KAYA,A.;AKSOY,M.;TEKELI,T. **Influence of sugar supplementation of the extender on the motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing.** Theriogenology, v.54, p.579-585, 2000.

ZIMMERMANN,M.F. **Efeito da diluição do crioprotetor dimetilformamida de amostras de semen equino descongeladas utilizando-se dois diluentes comerciais.** 2007, 65p, Dissertação(Mestrado), Universidade de Brasília-Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.

ZÚCCARI,C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina.** Tese de Doutorado apresentada em Botucatu, SP, 1998.

8. ANEXOS

8.1 FICHA PARA AVALIAÇÃO DE SÊMEN FRESCO

Animal _____	Codificação do Animal: _____
Data _____	Partida: _____
Responsável _____	Hora _____
Tempo de reação _____	Tempo para monta: _____
Tempo de monta _____	Nº de Montas _____
	Ejaculado Nº _____

Volume (ml) _____	Coloração _____
	Aspecto _____
Motilidade (%) _____	Vigor (0-5) _____
<u>CONCENTRAÇÃO</u>	
_____ + _____ = _____ /2 = _____ x _____ = _____ 10^6 /ml	
Número de SPTZ móveis no ejaculado = _____	

Volume de sêmen a ser utilizado (1.800×10^6) = _____
Volume de sêmen em cada tubo (seis tubos) = _____

Motilidade pós-diluição (%) _____	Vigor pós-diluição(0-5) _____
-----------------------------------	-------------------------------

Observações:

8.2 COMPOSIÇÃO E FÓRMULAS DOS DILUIDORES UTILIZADOS

Diluidor	Composição
INRA 82 [®]	Gema de ovo e leite desnatado. Foi adicionado 4% de glicerol ¹ momento antes da utilização do diluidor.
BOTUCRIO [®]	Açúcares e substratos de cultivo celular como fontes de macromoléculas, gema de ovo, leite desnatado, 4% metilformamida e 1% glicerol ² .
MERCK GEMA	Solução 1 (glicose anidra ³ = 6g; citrato de sódio ⁴ = 0,37g; EDTA disódico ⁵ = 0,37 g; bicarbonato de sódio ⁶ = 0,12g; penicilina ⁷ = 100.000UI; água destilada q.s.p.) = 25ml Solução Lactose ⁸ 11% = 50ml Gema de Ovo = 20ml Ovus es parte = 0,5ml Glicerol ² = 4 ml

¹ Glicerol PA (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil)

² Papa et al. (2002).

³D+ Glucose Anidra PA (dextrose) (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

⁴Citrato de Sódio PA Tribásico Dihidratado (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

⁵EDTA PA Sal Dissódico (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

⁶Bicarbonato de Sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, Estados Unidos)

⁷Cristacilina – Benilpenicilina potássico 5.000.000 UI (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil).

⁸D+Lactose PA Monohidratada (Vetec Química Fina, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

8.3 AJUSTE DO HTMA-IVOS-10 PARA A REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES SEMINAIS EM EQUINOS

Características	Ajuste
Número de pontos examinados	30
Contate das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contaste para células imóveis	30 pixels
Referência para velocidade alta (VCL)	<70 μ /s
Referência para velocidade média (VAP)	<30 μ /s
Referência para velocidade lenta (VSL)	<20 μ /s
Lentos contados como imóveis	Não
Magnificação	1,95

8.4 FICHA DE DESCONGELAÇÃO

FICHA PARA ANÁLISES DE SÊMEN PÓS-DESCONGELAÇÃO

Animal: _____ Partida: _____

Data da análise: _____ Codificação do Animal: _____

ANÁLISES CASA (Computer-Assisted Semen Analyzes)

PARTIDA	MT (%)	MP (%)	VAP (µm/s)	VSL (µm/s)	VCL (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	AREA (µm)	RAPID (%)	MEDIUM (%)	SLOW (%)	STATIC (%)	INT (%)

MT – Motilidade total (%)

MP – Motilidade progressiva (%)

VAP – Velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (µm/s)

VSL – Velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem no primeiro ponto analisado e final no último (µm/s)

VCL – Velocidade espermática ao longo da trajetória real (µm/s)

ALH – Deslocamento lateral da cabeça espermática (µm)

BCH – Frequência de batimento flagelar (Hertz)

STR - Índice retilíneo (%)

LIN – Linearidade (%)

AREA – Tamanho da cabeça (µm)

RAPID – Percentual de espermatozoides rápidos

MEDIUM - Percentual de espermatozoides médios

SLOW - Percentual de espermatozoides lentos

STATIC - Percentual de espermatozoides estáticos

INT – espermatozoides íntegros – coloração com sondas fluorescentes

8.5 SOLUÇÕES DE ESTOQUE PARA UTILIZAÇÃO NA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA

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

8.6 SOLUÇÕES DE TRABALHO PARA UTILIZAÇÃO NA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA PARA AVALIAÇÃO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA

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

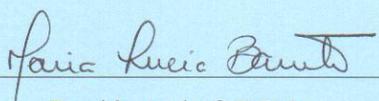
8.7 CERTIFICADO DO COMITÊ EM PESQUISA ANIMAL



Serviço Público Federal
Universidade Federal Fluminense
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa Animal

*C*ertificamos que o projeto nº 0044/08, intitulado “ AVALIAÇÃO DE DILUIDORES E MÉTODOS DE ENVASE NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR.” sob a orientação do Prof. Dr. FELIPE ZANDONADI BRANDÃO (pesquisador responsável) da FACULDADE DE VETERINÁRIA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal do COBEA e obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) em nove de outubro de 2008.

Niterói, 17 de outubro de 2008.


Presidente do C.E.P.A.

8.8 AVALIAÇÕES PÓS-DESCONGELAMENTO CONSIDERANDO DILUIDORES E MÉTODO DE ENVASE

Tabela 4.3 Motilidade total (MT) e progressiva (MP) pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelados nos diluidores INRA 82, Botucrio e Merck Gema e envasados em palhetas de 0,25 e 0,50ml avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio).

	MT (%)	MP (%)
INRA 82/0,25	7,95 \pm 6,71(23)	2,69 \pm 2,80(23)
INRA 82/0,50	10,08 \pm 8,32(24)	3,41 \pm 3,61(24)
BOTUCRIO/0,25	38,75 \pm 16,73(24)	18,45 \pm 12,23(24)
BOTUCRIO/0,50	44,04 \pm 16,86(24)	20,29 \pm 12,16(24)
MERCK/0,25	13,00 \pm 14,23(23)	5,74 \pm 8,74(23)
MERCK/0,50	17,79 \pm 14,40(24)	7,37 \pm 8,05(24)

*o número entre parêntese refere-se ao n

Tabela 4.4 Velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem no primeiro ponto analisado e final no último (VSL) e velocidade espermática ao longo da trajetória real (VCL) no pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelados nos diluidores INRA 82, Botucrio e Merck Gema e envasados em palhetas de 0,25 e 0,50ml avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio).

	VAP(μ m/s)	VSL(μ m/s)	VCL(μ m/s)
INRA 82/0,25	63,91 \pm 29,79(23)	51,08 \pm 22,73(23)	118,39 \pm 60,92(23)
INRA 82/0,50	63,79 \pm 29,65(24)	49,58 \pm 22,29(24)	123,75 \pm 61,58(24)
BOTUCRIO/0,25	78,20 \pm 16,02(24)	66,66 \pm 13,07(24)	149,00 \pm 24,74(24)
BOTUCRIO/0,50	79,54 \pm 15,60(24)	66,62 \pm 12,72(24)	152,37 \pm 24,35(24)
MERCK/0,25	66,70 \pm 11,17(23)	59,47 \pm 8,88(23)	106,36 \pm 25,94(23)
MERCK/0,50	67,62 \pm 9,15(24)	60,50 \pm 7,23(24)	112,33 \pm 17,63

*o número entre parêntese refere-se ao n

Tabela 4.5 Percentual de espermatozoides rápidos (RAPID), percentual de espermatozoides médios (MEDIUM), percentual de espermatozoides lentos (SLOW), percentual de espermatozoides estáticos (STATIC) no pós-descongelamento do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador congelados nos diluidores INRA 82, Botucrio e Merck Gema e envasados em palhetas de 0,25 e 0,50ml avaliados pelo sistema computadorizado (média \pm desvio).

	RAPID (%)	MEDIUM (%)	SLOW (%)	STATIC (%)
INRA 82/0,25	4,04 \pm 3,83(23)	3,91 \pm 3,61(23)	16,26 \pm 11,31(23)	67,00 \pm 25,82(23)
INRA 82/0,50	5,16 \pm 5,13(24)	4,62 \pm 4,03(24)	17,79 \pm 12,09(24)	64,08 \pm 25,47(24)
BOTUCRIO/0,25	23,91 \pm 16,29(24)	14,83 \pm 7,14(24)	23,83 \pm 11,30(24)	37,41 \pm 22,73(24)
BOTUCRIO/0,50	27,29 \pm 16,45(24)	16,79 \pm 7,47(24)	22,79 \pm 8,13(24)	33,16 \pm 21,53(24)
MERCK/0,25	6,82 \pm 10,94(23)	6,04 \pm 4,62(23)	17,08 \pm 19,85(23)	70,00 \pm 27,46(23)
MERCK/0,50	8,79 \pm 10,99(24)	8,87 \pm 5,90(24)	17,00 \pm 15,04(24)	65,29 \pm 23,43(24)

*o número entre parêntese refere-se ao n

Tabela 4.6 Percentual de espermatozoides íntegros de garanhões Mangalarga Marchador congelados nos diluidores INRA 82, Botucrio e Merck Gema e envasados em palhetas de 0,25 e 0,50ml avaliados pela microscopia de epifluorescência (média \pm desvio).

Respostas	Íntegro (%)
INRA 82/0,25	34,74 \pm 16,64 (23)
INRA 82/0,50	33,50 \pm 17,63 (24)
BOTUCRIO/0,25	33,75 \pm 11,15 (24)
BOTUCRIO/0,50	32,83 \pm 11,94 (24)
MERCK GEMA/0,25	32,74 \pm 10,17 (23)
MERCK GEMA/0,50	34,58 \pm 12,05 (24)

*o número entre parêntese refere-se ao n