

Rodrigo Garcia Barros

Criopreservação de sêmen equino: uma revisão

Araçatuba

2013

Criopreservação de sêmen equino: uma revisão

Trabalho de Pesquisa e Revisão
apresentado à Faculdade de
Medicina Veterinária da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de
Araçatuba, para obtenção do grau de Médico
Veterinário.

Aluno: Rodrigo Garcia Barros
Supervisor: Professor Alicio Martins Júnior

Araçatuba
2013

ENCAMINHAMENTO

“Encaminhamos o presente Trabalho de Pesquisa e Revisão para que o Conselho de Estágios Curriculares tome as providências cabíveis às bancas examinadoras do mesmo”

Rodrigo Garcia Barros

Professor Alicio Martins Júnior

Araçatuba
2013

SUMÁRIO

RESUMO	01
1. INTRODUÇÃO	02
2. MATERIAL E MÉTODOS	04
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	04
3.1. CRIOPRESERVAÇÃO	04
3.2. DANOS CAUSADOS PELA CRIOPRESERVAÇÃO	05
3.3. COMPONENTES DOS DILUENTES	06
3.3.1. CRIOPROTETORES	07
3.3.1.1. CRIOPROTETORES NÃO PENETRANTES	08
3.3.1.1.1. AÇÚCARES	08
3.3.1.1.2. GEMA DE OVO	08
3.3.1.1.3. LEITE	09
3.3.1.2. CRIOPROTETORES PENETRANTES	10
3.3.1.2.1. GLICEROL	10
3.3.1.2.2. ETILENOGLICOL	11
3.3.1.2.3. DIMETILSUFÓXIDO (DMSO)	11
3.3.1.2.4. AMIDAS	12
3.3.2. ANTIBIÓTICOS	13
3.3.3. AGENTES COM PODER TAMPÃO	13
3.4. VARIAÇÃO INDIVIDUAL DOS GARANHÕES	14
4. CONCLUSÃO	15
5. BIBLIOGRAFIA	16

RESUMO

A utilização do sêmen resfriado na espécie equina é amplamente difundida, no entanto, quando se trata do sêmen congelado existem certos entraves, os quais tornam o emprego desta biotécnica limitado. Porém seu uso está crescendo e com isso pesquisas com meios diluidores e protocolos de congelação têm sido realizados, a fim de se estabelecer um protocolo que seja eficiente para a congelação do sêmen da maioria dos garanhões. Essa revisão sistemática tem como objetivo a análise de estudos que tratam da congelabilidade do sêmen equino, bem como os principais componentes de um meio diluidor, a fim de demonstrar suas funções e fornecer alternativas para a substituição ou associação, principalmente de crioprotetores. Para tanto, foram utilizadas bases de dados com a seguinte estratégia: criopreservação, congelamento, diluentes, crioprotetores, glicerol, leite, sêmen e equino, presentes no título ou resumo. Dentre os artigos encontrados foram selecionados 15 artigos nas línguas portuguesa, espanhola e inglesa, publicados em revistas científicas ou teses de mestrado, doutorado e trabalhos de conclusão de curso. Tais artigos permitiram concluir que não existem protocolos de congelamento definidos para grupos de animais, mas que deve ser observado cada indivíduo, ressaltando sua peculiaridade e estabelecendo o melhor diluente e protocolo.

Palavras-chave: congelação, crioprotetores, espermatozoide, glicerol, amidas.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a confederação de agricultura e pecuária do Brasil (CNA), o complexo do agronegócio no Brasil, movimentada cerca de R\$ 7,3 bilhões por ano. O Brasil possui o terceiro maior rebanho equino do mundo com 5,9 milhões de cabeças, gerando milhares de empregos diretos e indiretos e contribuindo para o produto interno bruto (PIB) nacional.

Por muitas décadas, o desenvolvimento e a utilização de inseminação artificial (IA) em equídeos, principalmente com sêmen congelado, esteve limitada por imposição das associações de criadores que não permitiam sua utilização (SAMPER, 2007). Recentemente, as associações dos criadores têm revisado esses conceitos e permitindo o registro dos produtos oriundos dessa biotecnologia, valorizando o mercado em nível mundial (CANISSO et al., 2008b; DE VITA, 2006).

A utilização de sêmen resfriado na espécie equina é amplamente difundida e sua principal vantagem é o baixo custo (ALMEIDA, 2006). No entanto, a utilização do sêmen congelado depara-se com alguns entraves (DE VITA, 2006), como a baixa fertilidade, quando comparado ao sêmen fresco ou refrigerado (ALMEIDA, 2006) e os danos causados à integridade estrutural da membrana plasmática do espermatozoide, com conseqüente diminuição da fertilidade pós-descongelamento (KLÖPPE et al., 1988; FÜRST, 2006)

Segundo De Vita (2006), a biotecnologia da IA se destaca por gerar inúmeras vantagens, tais como: diminuição de custos com aquisição de animais geneticamente superiores, armazenamento por tempo indeterminado, utilização do sêmen de animais excepcionais mesmo após a perda da capacidade reprodutiva ou morte, seguro biológico, racionalização do uso do reprodutor com aumento da relação macho/fêmea, controle de doenças venéreas e facilidade no transporte a longas distâncias.

No entanto, os resultados obtidos tanto através de análises laboratoriais como de índices de prenhez são muito variáveis, demonstrando a necessidade de uma padronização na metodologia empregada (DE VITA, 2006; CANISSO et al., 2008a).

Segundo Almeida (2006), um dos problemas na criopreservação do sêmen equino é a grande variabilidade individual entre os animais, parecendo estar relacionado com aspectos genéticos e com a monta natural. Outro grande problema é a vida útil reduzida do sêmen no trato reprodutivo da égua, dificultando a

inseminação artificial com sêmen congelado e, também, o grande tempo de observação, para que a inseminação ocorra em um momento próximo da ovulação, não ultrapassando 6 horas pós-ovulação. A criopreservação do sêmen equino ainda não atingiu níveis desejados, revelando baixos resultados na congelabilidade, devido à falta de padronização na metodologia de congelamento, em decorrência, observa-se uma grande variabilidade de resultados (DE VITA, 2006). Segundo Terraciano et al. (2008), o tipo de curva de congelamento, também, influencia diretamente no grau de lesão celular.

Para o congelamento do sêmen equino diferentes diluentes, em diferentes concentrações tem sido utilizado. Essa diferença na composição dos diluentes pode afetar o processo de criopreservação (SNOEK et al., 2007). Além do meio diluidor, a velocidade e o tempo de centrifugação, curva de resfriamento e congelamento, tempo de equilíbrio, concentração espermática por dose inseminante e frequência de inseminação, também afetam o processo de criopreservação (FÜRST, 2006).

Segundo Snoek et al. (2007), os diluentes mais utilizados para uso de sêmen refrigerado são: Naumienkov e Romanova, INRA-82, lactose-EDTA-gema de ovo e diluidor Kenney, os quais possuem em sua formulação basicamente açúcares, eletrólitos, gema de ovo e glicerol em diferentes concentrações; além disso, os meios INRA-82 e Kenney têm com componente base o leite. De uso mais restrito são citados os meios como o Gent, MP-50, Dulbeccos Basal Medium Eagle (BME) e glicina-gema de ovo.

Essa grande variedade de diluentes de diferentes composições é indicativo de que o diluente ideal, aquele que preserve a viabilidade espermática pós-descongelamento para a maioria dos garanhões, ainda não foi desenvolvido (SNOEK et al., 2007). Logo, essa diversidade deve estar relacionada ao fato de existir uma variabilidade na sensibilidade espermática à congelação/descongelação entre garanhões e ejaculados de um mesmo garanhão (SAMPER et al., 1991; SNOEK et al., 2007).

O presente trabalho buscou dados pré-existentes na literatura, visando identificar o melhor meio diluidor para a criopreservação do sêmen equino, reunindo dados sobre os componentes e suas funções sobre os espermatozoides durante a criopreservação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O levantamento bibliográfico foi realizado nos meses de abril e maio de 2013, abrangendo diversas bases de dados (Periódicos Capes, Bibliotecas – Unesp, Pubmed, Pubvet, Google e Scielo). A busca foi realizada através de palavras-chave: criopreservação, diluentes, crioprotetores, sêmen, equino, glicerol, leite, gema de ovo e congelamento. Foram encontrados 177 estudos, os quais foram selecionados, primeiramente, através do título, excluindo-se os artigos que não se referiam a equídeos. Então, foram desconsiderados artigos que utilizavam substâncias experimentais no meio diluente, tais como própolis, gema de ovo de ema, entre outros, bem como textos que não se tratavam de congelamento; além disso, foram selecionados, preferencialmente, estudos na língua portuguesa. A inclusão ou não dos estudos foi definida por análise do título e resumo, além do sumário, quando presente, observando-se se o trabalho reunia dados pertinentes ao assunto. Tais critérios resultaram na seleção de 15 artigos, na língua portuguesa e espanhola. Foram, também, selecionadas as bibliografias mais citadas nesses artigos encontrados e buscadas nas mesmas bases de dados, desta vez pelo próprio título e selecionando mais 32 artigos, totalizando 47 artigos pesquisados, nas línguas portuguesa, inglesa e espanhola, publicados em revistas científicas, bem como teses de mestrado, doutorado e trabalhos de conclusão de curso.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. CRIOPRESERVAÇÃO

Segundo Ketth (1998), no processo de criopreservação o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea (37 °C) à temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), o que parece não ocasionar maiores danos ao espermatozoide, desde que diluído em meio adequado. O estresse inicia-se quando o espermatozoide atinge a temperatura de 5 °C, passando do estado líquido para a fase de gel (GRAHAM, 1996; DE VITA, 2006).

Para diminuir os danos causados pelo frio deve-se atentar ao controle da taxa de resfriamento entre 19 °C e 8 °C e, também, pela adição de lipídeos e

lipoproteínas ao diluente (GRAHAM, 1996; FÜRST, 2006), além do uso de curvas lentas de resfriamento e uso de crioprotetores.

Entre -5 °C e -10 °C inicia-se a formação de cristais extracelulares que permanecem super-resfriados; logo, ocorre a troca de água entre os meios intra e extracelular para manter a osmolaridade, provocando desidratação das células, portanto, nesse ponto a curva de congelamento deve ser rápida o suficiente para evitar o contato do espermatozoide desidratado com o meio hiperosmótico, mas lenta o suficiente para que a água intracelular não congele (FÜRST, 2006; DE VITA, 2006).

Segundo De Vita (2006), se o semên foi congelado rapidamente, então o descongelamento, também, deve ser feito da mesma maneira, o mesmo ocorre se o sêmen tiver sido congelado de forma lenta, deve ser descongelado de forma lenta também.

As perdas ocorridas no processo de criopreservação são compensadas com um grande número de espermatozoides durante a inseminação, sendo verdadeiro para touros e outras espécies animais (WATSON, 2000; ZIMMERMANN, 2007). Estima-se que somente 30-40% dos garanhões produzam sêmen de boa qualidade para o congelamento (ZIMMERMANN, 2007).

3.2. DANOS CAUSADOS PELA CRIOPRESERVAÇÃO

Os espermatozoides são passíveis de danos durante toda a etapa de criopreservação, desde a colheita até a inseminação (GRAHAM, 1996; DE VITA, 2006). Segundo Fürst (2006), o processo de criopreservação reduz a viabilidade da célula espermática. Logo, as lesões ocasionadas são advindas de vários fatores, tais como: a formação de cristais de gelo intracelular devido a mudança de temperatura, alteração na permeabilidade da membrana do espermatozoide, toxicidade dos crioprotetores e o estresse osmótico, associado à adição ou remoção de crioprotetores (WATSON, 2000; FÜRST, 2006).

A resposta celular mais importante fica por conta da perda de água e formação de cristais intracelulares durante o congelamento (FÜRST, 2006). Portanto, o uso de crioprotetores é fundamental; no entanto, este também possui efeitos tóxicos, podendo provocar efeitos deletérios como aumento da permeabilidade da membrana plasmática (FAHY, 1986; DE VITA, 2006).

Quando os cristais de gelo começam a se formar há o aumento da temperatura, que pode ser deletério ao espermatozoide (FÜRST, 2006). Ainda, entre -5 °C e -10 °C inicia-se a formação de gelo extracelular, mudando o gradiente osmótico e causando desidratação da célula. Assim, a curva de congelação deve ser adaptada para que ocorra a rápida congelação, evitando o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico, mas deve ser lenta para evitar a congelação intracelular (FÜRST, 2006). A desidratação é um evento desejável, pois ela reduz a formação de grandes cristais de gelo intracelular; no entanto, a desidratação severa promove desnaturação de macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, provocando um colapso da membrana (MEDEIROS, 2002; FÜRST, 2006).

3.3. COMPONENTES DOS DILUENTES

Como forma de otimizar a qualidade do sêmen e protegê-lo, deve-se acrescentar diluentes (ZIMMERMANN, 2007). Por conseguinte, esses diluentes são adicionados com o intuito de proteger os espermatozoides dos efeitos críticos do congelamento (AIDAR, 2013).

Assim, devem ser adicionados crioprotetores e macromoléculas que terão função de proteger a membrana plasmática das possíveis injúrias (AIDAR, 2013); ainda, deve-se adicionar fonte de energia para o metabolismo espermático e meio tampão para manutenção do pH (PARKS e GRAHAM, 1992; AIDAR, 2013).

Um diluidor ideal deve propiciar: pressão osmótica compatível com a dos espermatozoides; apropriado equilíbrio mineral e adequada combinação de nutrientes; capacidade de neutralizar catabólitos espermáticos; substâncias com capacidade protetora para as alterações de temperatura, principalmente para o frio; capacidade de estabilizar membranas e sistema enzimático; ambiente livre de microorganismos patogênicos; baixo custo; não oferecer toxicidade ao espermatozoide; baixa irritabilidade ao sistema genital e fácil aquisição (AMANN e PICKETT, 1987; SILVA FILHO, 1994; AIDAR, 2013; CANISSO et al., 2008a).

Faz-se necessário ressaltar que, a composição adequada para um diluidor seminal não depende apenas de uma adequada concentração de crioprotetores, tanto intra como extracelulares, mas de uma combinação adequada de todas as substâncias que são utilizadas, levando-se em consideração a fonte de energia para

os espermatozoides, as substâncias não iônicas, o tipo de macromoléculas e a concentração e o tipo ideal de crioprotetor (SNOECK et al, 2007).

3.3.1. CRIOPROTETORES

Os crioprotetores são substâncias capazes de promover a sobrevivência dos espermatozoides durante a congelação e descongelação, apesar de seu mecanismo de ação não estar bem elucidado (FÜRST, 2006). Entretanto, Mazur (1970), Meryman et al. (1977) e Aidar (2013), contestaram tais argumentos, quando relatam que o mecanismo de ação dos crioprotetores baseia-se na redução do ponto de solidificação da solução, promovendo um maior tempo para a desidratação da célula, assim reduzindo a formação dos cristais de gelo intracelulares.

Embora os crioprotetores sejam essenciais ao processo de congelamento dos espermatozoides, eles podem apresentar efeitos tóxicos e diminuir as taxas de fertilidade quando em concentrações elevadas (DE VITA, 2006). Devido aos efeitos tóxicos dos crioprotetores, eles não garantem a sobrevivência de 100% dos espermatozoides, dependendo da concentração utilizada do crioprotetor no meio diluidor (FAHY, 1986; FÜRST, 2006).

Segundo Zimmermann (2007), a adição de crioprotetores em múltiplas etapas, associados ao resfriamento da amostra de forma lenta antes do congelamento, é o tratamento mais eficaz para preservar a viabilidade das células espermáticas de equinos.

Keith (1998) classificou os crioprotetores em dois grupos: penetrantes (intracelulares) e não penetrantes (extracelulares). Os crioprotetores intracelulares atuam reduzindo o ponto crioscópico intracelular permitindo que uma maior quantidade de água fique no estado líquido, quando submetidas à baixas temperaturas, reduzindo a concentração intracelular de solutos, criando um ambiente menos deletério à célula espermática durante o congelamento (WATSON, 1995; AIDAR, 2013). Alguns exemplos de crioprotetores são: glicerol, dimetil sulfóxido, etileno glicol e propileno glicol, que podem ser utilizados individualmente ou em associação (ALVARENGA, 2002; AIDAR, 2013)

Os crioprotetores extracelulares atuam como solutos ou colóides, não servindo como solventes; alguns exemplos são: açúcares (lactose, frutose, rafiose ou trealose) e polímeros sintéticos (metil celulose) (GRAHAM, 1996; AIDAR, 2013).

3.3.1.1. CRIOPROTETORES NÃO PENETRANTES

3.3.1.1.1. AÇÚCARES

A atuação dos açúcares, como parte dos diluentes, ocorre através da pressão osmótica, promovendo a desidratação celular, reduzindo a água passível de ser congelada do interior da célula, diminuindo, também, os problemas que são causados pela cristalização da água durante o congelamento (AISEN, 2002; AIDAR, 2013 e FÜRST, 2006). Além disso, o açúcar tem função de atuar como substrato energético para o espermatozoide e proteção à membrana plasmática durante o processo de congelamento descongelamento (YILDIZ et al., 2000; AIDAR, 2013 e FÜRST, 2006).

De acordo com De Leeuw (1993), na maioria dos casos os dissacarídeos (sacarose e trealose) possuem maior eficiência no processo de estabilizar a bicamada da membrana, quando comparados aos monossacarídeos, isto se deve ao fato de restaurarem o percentual de água ao redor das cabeças dos fosfolipídeos, inibindo os danos causados pela desidratação extrema.

Da mesma forma Aisen (2002), relatou que açúcares como trealose, lactose e manose, por meio de interações com os fosfolipídeos da membrana e efeito osmótico, protegem a célula contra o choque térmico.

Os açúcares atuam, ainda, aumentando o percentual de água super-resfriada durante o processo de congelamento, reduzindo as concentrações de sais nos canais remanescentes, logo, reduzem o efeito osmótico (MAZUR, 1984; FÜRST, 2006).

Mesmo entre os dissacarídeos, Aisen et al. (2002) e Juliani et al. (2008), relataram que a trealose se mostrou mais efetiva que a rafinose. Essa ação da trealose, quando comparada com outros dissacarídeos, pode ser devida a interação específica com a bicamada lipídica da membrana.

3.3.1.1.2. GEMA DE OVO

A gema de ovo tem sido muito usada em protocolos de criopreservação de sêmen de várias espécies, por conferir proteção extracelular (FÜRST, 2006). Os

principais responsáveis por essa proteção sobre a membrana celular são os fosfolípidos presentes na gema (ENGLAND, 1993; FÜRST, 2006).

Moussaet al. (2002) observaram que, a proteção ocorre devido à presença das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que aderem a membrana celular durante a criopreservação, tornando-a mais resistente e preservada. Amann e Graham (1993) foram concordes com tais informações, relatando que a gema de ovo promove proteção aos espermatozoides contra o choque térmico através das lipoproteínas de baixa densidade.

Fürst (2006) mencionou que, além disso, o ovo protege substituindo a perda dos fosfolípidos, aparentemente induzindo alterações transitórias na composição da membrana plasmática, evitando que esta se rompa. A gema do ovo, também, estabiliza a membrana espermática, neutralizando os componentes deletérios advindos do plasma seminal (AURICH, 2005; AIDAR, 2013).

Pode ser que haja interações entre os lipossomas, que compõe o colesterol presente na gema, o cálcio e outros componentes do meio de congelação, afetando a fração de água não congelada (FÜRST, 2006). Logo, visando diminuir os efeitos deletérios do íon cálcio, durante o processo de congelação, alguns autores passaram a utilizar o etileno diaminotetraacetatodissódico (EDTA) nos meios diluidores para criopreservação do sêmen equino (FÜRST, 2006), com a função de quelar o cálcio do meio extracelular, evitando seu influxo para o espermatozoide (WATSON, 1981; FÜRST, 2006)

Porém, a gema de ovo tem a progesterona como componente natural, isto poderia induzir uma capacitação espermática precoce, podendo levar a uma redução na fertilidade (AIDAR, 2013).

3.3.1.1.3. LEITE

O leite é um dos diluentes mais utilizados, talvez pelo fato de possuir lipoproteínas parecidas com as da gema do ovo, promovendo proteção da membrana plasmática (AMANN e GRAHAM, 1992; AIDAR, 2013). Da mesma forma, Watson (1981) mencionou que as proteínas do leite podem estabilizar elementos proteicos da membrana espermática. Ainda, Hochachka (1987) e Aidar (2013) afirmaram que a caseína, proteína presente no leite, liga-se fortemente com os íons cálcio, impedindo o acúmulo de quantidade tóxica de cálcio intracelular, levando a

danos na membrana; o leite possui ainda lactenina, que é uma proteína de baixo peso molecular e bactericida para cepas de *Streptococcus spp.*

Fürst (2006) relatou que a eficiência das proteínas do leite na criopreservação do sêmen se assemelha a da gema, devido à composição proteica, que atua como tampão, além de possuir propriedade quelante de metais pesados, contribuindo para minimização dos danos causados durante o congelamento.

Já se verificou a existência de diferenças significativas quanto ao uso do leite desnatado e integral na qualidade do sêmen conservado, evidenciando que não são os lipídeos do leite os responsáveis pela proteção (MOTTA, 2010).

3.3.1.2. CRIOPROTETORES PENETRANTES

3.3.1.2.1. GLICEROL

A descoberta da ação do glicerol foi de grande importância na congelação do sêmen, pois até então esse procedimento não era possível (KEITH, 1998; HOLT, 2000; CANDEIAS, 2010).

O glicerol é um álcool que contém três grupos funcionais de hidroxila, os quais se ligam fortemente com o hidrogênio das moléculas de água (OLIVEIRA et al., 2013), assim tornando a desidratação do espermatozoide mais lenta durante a congelação (FÜRST, 2006; e CANDEIAS, 2010). Há evidências de que o glicerol se ligue aos fosfolipídios, diminuindo sua fluidez e interferindo na permeabilidade da membrana (PARKS E GRAHAM, 1992, FÜRST, 2006 e CANDEIAS, 2010).

O uso do glicerol na criopreservação do sêmen equino pode estar relacionado à baixa motilidade e, conseqüente, redução de fertilidade pós-descongelamento (DE VITA, 2006); devido sua toxicidade, que parece causar desnaturação das proteínas e ocasionar mudanças nos eventos citoplasmáticos, devido ao aumento da viscosidade por causa do glicerol que entrou na célula, promovendo alteração direta na membrana plasmática, alterações no glicocálix e nas proteínas de superfície celular (DE VITA, 2006), também Alvarenga et al. (2000) e Fürst (2006) concordaram com essas afirmações.

Apesar dos efeitos tóxicos que o glicerol apresenta, Amann e Pickett (1987) afirmaram que não foram encontrados crioprotetores mais eficientes que o glicerol. Oliveira et al (2013) corroboraram com tal informação ao testarem diversos

crioprotetores, entre eles o glicerol, obtendo maior porcentagem de motilidade total e progressiva nos espermatozoides preservados em meio contendo glicerol.

A concentração ideal de glicerol para a sobrevivência das células é dependente da curva de congelação e de outros componentes dos diluentes, assim como do método de envase (FÜRST, 2006). No entanto, Candeias (2010) afirmou que a maioria dos diluidores utilizados apresentam entre 2,5 e 5% de glicerol em sua composição. Já Fürst (2006), observou que, quando se usa “pellets” obtém-se maior motilidade com concentrações entre 3 e 4%; com ampolas a concentração varia de 6 a 8% e com palhetas entre 4 e 6% deste crioprotetor.

De Leew et al. (1993) afirmaram que métodos convencionais de congelação, em palhetas de 0,25 mL ou de 0,5 mL, têm utilizado em torno de 7% de glicerol como ótima concentração para diluentes com base de gema de ovo.

3.3.1.2.2. ETILENOGLICOL

O etilenoglicol é definido quimicamente como um álcool, com quatro pares de elétrons isolados, os quais têm a possibilidade de ligação com os átomos de hidrogênio (KEITH, 1998; CANDEIAS, 2010; OLIVEIRA et al., 2013). A estrutura molecular é um parâmetro importante para determinar se um crioprotetor é eficiente, já que estes devem possuir afinidade pela água, obtidas através dos agrupamentos amina e hidroxila de sua composição, favorecendo a formação de pontes de hidrogênio com a água (BAUDOT et al, 2002; DE VITA, 2006)

Alvarenga et al. (2000) promoveram um estudo comparativo entre o glicerol e o etilenoglicol, demonstrando ação semelhante entre eles; quando combinados possibilitou a redução do glicerol, logo, diminuindo seu efeito tóxico. Mercadante et al. (1995) e Cadeias (2010) corroboraram tal afirmação, quando se utiliza o etilenoglicol como crioprotetor; demonstraram, ainda, não haver diferença significativa entre este e o glicerol, em relação a motilidade pós descongelamento e a fertilidade pós-inseminação artificial.

3.3.1.2.3. DIMETILSULFÓXIDO (DMSO)

O dimetilsulfóxido é muito utilizado como crioprotetor, uma vez que este penetra rapidamente na membrana plasmática (CANDEIAS, 2010). No entanto,

apresenta inconveniente de causar alterações na membrana, danificando e inviabilizando as células, tornando este crioprotetor tóxico (CANDEIAS, 2010).

O DMSO atua como molécula eletricamente carregada, interagindo eletrostaticamente com os grupos fosfato das membranas tanto interna como externa dos espermatozoides, promovendo certa proteção contra eventuais danos que possam ser causados durante a criopreservação (CANDEIAS, 2010).

Ao serem adicionadas concentrações entre 1 e 9% de DMSO em um diluente contendo lactose, gema de ovo e citrato associado ou não ao glicerol, a célula espermática apresentou maior viabilidade pós-descongelamento, sendo este protocolo superior ao uso isolado do glicerol (KEITH, 1998; CANDEIAS, 2010). No entanto, segundo Alvarenga (2003) o DMSO tem sido menos eficiente, quando comparado com outros crioprotetores penetrantes, quanto aos parâmetros de motilidade total e progressiva.

3.3.1.2.4. AMIDAS

Segundo Oliveira et al. (2013), Fürst (2006) e Candeias (2010), as amidas são formadas por três pontes de ligação ao hidrogênio, metade das ligações do glicerol; elas são menos viscosas e menos solúveis em água, quando comparadas ao glicerol, logo tem uma menor permeabilidade a membrana; mas essa característica é favorável na criopreservação, pois diminui a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico.

Keith (1998) utilizou nos diluidores de sêmen equino amidas, tais como acetamida, metilformamida, formamida e dimetilformamida, comparando os resultados de motilidade progressiva com o glicerol e etilenoglicol, obtendo o melhor resultado de motilidade progressiva pós-descongelamento com glicerol, seguido de metilformamida e dimetilformamida.

Alvarenga et al. (2005) e Candeias (2010) afirmaram que, dentre as amidas, a dimetilacetamida foi a que conferiu menor proteção aos espermatozoides contra os danos causados pela criopreservação, pois esta apresenta alto peso molecular (M) (87,12M), quando comparada com a dimetilformamida (73,09M) e metilformamida (50,79M). Melo et al. (2007) e Candeias (2010) afirmaram que, a superioridade da metilformamida é devido ao seu baixo peso molecular, resultando em menor dano osmótico à célula espermática.

A dimetilformamida tem se mostrado cada vez mais eficiente no congelamento de tecidos vivos, melhorando os processo de vitrificação e estabilização da água, superando o glicerol (BAUDOT e BOUTRON, 1998; OLIVEIRA et al., 2013). Da mesma forma, Oliveira et al. (2013) relataram que, o uso deste criopreservador penetrante vem sendo empregada cada vez mais no sêmen de garanhões devido aos bons resultados obtidos.

As amidas apresentam resultados muito favoráveis nos diversos parâmetros espermáticos avaliados, em especial para garanhões que apresentam resultados desfavoráveis ao uso de glicerol (ALVARENGA et al., 2000; CANDEIAS, 2010 e ZIMMERMANN, 2007).

3.3.2. ANTIBIÓTICOS

A utilização de antibióticos nos meios diluidores é recomendada para reduzir o crescimento bacteriano durante a manipulação do sêmen; no entanto, esses antibióticos não devem interferir na qualidade do sêmen ou prejudicar a microflora vaginal, estimulando o crescimento de bactérias patogênicas (AIDAR, 2013).

Para isso são utilizados vários antibióticos como penicilina, estreptomicina, kanamicina, gentamicina, entre outros, além da associação entre estes, que atuam como bactericida de amplo espectro (NOGUEIRA, 2011). A colheita do sêmen com vagina artificial e a utilização de diluidores com antibióticos na formulação diminuiu o número de éguas contaminadas pós-inseminação (NOGUEIRA, 2011).

3.3.3. AGENTES COM PODER TAMPÃO

Como o metabolismo espermático funciona de forma contínua, produzindo grandes quantidades de catabólitos tóxicos, levando ao aumento do ácido láctico no meio, alterando muito o pH, podendo ocasionar a morte dos espermatozoides, tornando necessário o uso de tampões (AIDAR, 2013). Primeiramente foi testado o fosfato para este fim, porém, o citrato de sódio possui maior eficiência para tal função, aumentando, ainda, a capacidade de diluição da gema de ovo ao meio líquido, fato esse que favorece a ação da gema sobre as células (HOLT, 2000; AIDAR, 2013).

3.4. VARIAÇÃO INDIVIDUAL DOS GARANHÕES

Segundo estudos de Alvarenga et al. (2003) e Candeias (2010), é estimado que somente 30 a 40% dos garanhões produzam sêmen de boa congelabilidade e consistentes variações na congelabilidade do sêmen entre as raças foram observadas.

Da mesma forma, De Oliveira (2007) afirmou que as características individuais podem influenciar a resposta dos espermatozoides ao crioprotetor e ao congelamento. Ainda, Candeias (2010) relatou que os espermatozoides dos garanhões respondem de maneira diferente à criopreservação e que a maioria dos garanhões produz sêmen de intermediária ou má qualidade com relação à congelabilidade.

Diferentes ejaculados provenientes do mesmo garanhão podem apresentar diferenças em sua habilidade na congelação (GRAHAM, 1996). Candeias (2010) demonstrou que de 80 garanhões das raças Hannoveriano, Holsteiner, Trackner e Quarto de Milha, metade apresentaram bons padrões de motilidade no sêmen pós-descongelamento; no entanto, nas raças como Mangalarga e Mangalarga Marchador, esse percentual caiu para apenas 15%, demonstrando que há variação entre raças e muitas vezes variação individual relacionado à congelabilidade e o uso do glicerol.

Medeiros (2007) avaliou 27 garanhões, encontrando nove com congelabilidade aceitável (raças Westfallen e Brasileiro de Hipismo), seis enquadrando-se no grupo intermediário (raças Quarto de Milha, Árabe, Mangalarga Marchador e Westfallen) e doze animais com níveis de congelabilidade não aceitáveis (todos da raça Mangalarga Marchador).

Segundo Candeias (2010), existe um fator racial que interfere na resistência espermática ao congelamento. Assim, animais da raça Mangalarga Marchador têm apresentado os piores resultados, quando comparado com outras raças. Alvarenga et al. (2003) e Candeias (2010) corroboram com tal informação afirmando que, a maioria dos garanhões desta raça apresenta pobre qualidade seminal pós-descongelamento, quando o glicerol é utilizado como crioprotetor. Alvarenga et al. (2003), em outro experimento, observaram que garanhões da raça Mangalarga Marchador tiveram seus parâmetros melhorados quando foi utilizado a dimetilformamida e metilformamida em comparação ao glicerol.

Um estudo cujo objetivo foi relacionar as variações de congelabilidade entre as raças, utilizando crioprotetores dimetilformamida a 5% e glicerol a 5%, constatou-se através da motilidade total e progressiva, avaliadas através de análise computadorizada, resultados superiores com o sêmen em dimetilformamida; foi observada, ainda, uma melhoria nos parâmetros avaliados em garanhões que apresentavam uma sensibilidade ao glicerol (ALVARENGA et al., 2003; CANDEIAS, 2010).

Cada animal tem uma variação na composição da membrana plasmática, podendo apresentar uma camada maior de colesterol e ácidos graxos, tornando-o mais resistente à congelação (OLIVEIRA et al., 2013).

4. CONCLUSÃO

Os artigos reunidos para a realização deste trabalho permitiram destacar os principais constituintes de um diluente, bem como as funções de cada componente e, também, permitiu fazer a substituição de componentes por outros de igual função ou de melhor atuação. Evidenciaram, ainda, que há muita variação individual entre ejaculados, indivíduos e raças, chamando a atenção ao fato de que, ainda, não existe um meio diluidor totalmente eficiente para o sêmen equinos e sim diluentes que atendem determinadas raças e indivíduos; portanto, torna-se necessário testar diferentes meios crioprotetores e protocolos para o congelamento do sêmen dos garanhões, a fim de abranger a maioria dos garanhões, ou seja, eficiente congelabilidade do sêmen e efetiva fertilidade após inseminação .

5. BIBLIOGRAFIA

- 1) AIDAR, N.B. **Criopreservação de sêmen eqüino**. Monografia – Universidade de Brasília – UnB/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.
- 2) AISEN, E.G et al. **Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen indifferent trehalose concentration**. Theriogenology, v. 57, p. 1801-1808, 2002.
- 3) ALMEIDA, J.L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação de sêmen eqüino**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2006.
- 4) ALVARENGA, M.A. et al. **Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using packaging systems**. Equine Veterinary Journal, v.6, p.541-545, 2000.
- 5) ALVARENGA, M. A. **Melhoria na congelação de sêmen de garanhões e das variações raciais com o uso da Dimethyl-formamida**. Tese (Livre docência) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2002.
- 6) ALVARENGA, M.A.. **The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen**. In: Workshop on Transporting Gametes and Embryos, Havemeyer Foundation, p.74-76, 2003.
- 7) AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. **Spermatozoal function**. Equine Reproduction, p. 715-745, 1992.
- 8) AMANN RP, GRAHAM JK. **Spermatozoal function**. Equine reproduction., p.715-745, 1993.
- 9) AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. **Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa**. Journal Equine Veterinary Science, v.7, p.145-173, 1987.
- 10) AURICH C. **Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa**. Animal Reproduction Science, v.89, p.65-75, 2005
- 11) Baudot A, Boutron P. **Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of diethylformamide and dimethylformamide**. Cryobiology, v.37, p.187-199, 1998.
- 12) BAUDOT, A. et al. **Thermal study of simple amino-alcohol solution**. Cryobiology, v.44, p.150-160, 2002.

- 13)CANDEIAS, M.L. **Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador.** Dissertação (Mestrado em Clínica e Reprodução Animal) – Universidade Federal fluminense, 2010.
- 14)CANISSO, I.F. et al. **Inseminação artificial em eqüinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado.** Revista acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais, v. 6, n. 3, p. 389-398, 2008a.
- 15)CANISSO, I.F. et al. **Congelamiento de semen de burro (*Equusasinus*).** Revista de investigaciones veterinarias Del Perú, v. 19, p113-125, 2008b.
- 16)CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA. **Estudo do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil.** Brasília, 2006.
- 17)DE OLIVEIRA, R.A. **Índice de prenhez com sêmen congelado de garanhões crioulo usando glicerol ou dimetilformamida como crioprotetores.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, 2007.
- 18)DE VITA, B. **Biotecnologia e inseminação artificial com sêmen congelado eqüino.** Monografia (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.
- 19)DE LEEUW, F.E. et al. **Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing.** Cryobiology, v. 30, p. 32-44, 1993.
- 20)ENGLAND, G.C W. **Cryopreservation of dog semen: a review.** Journal of Reproduction and Fertility (Supplement.), v. 47, p. 243-255, 1993.
- 21)FAHY, G. M. **The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology.** Cryobiology, v. 3, p. 1-13, 1986.
- 22)FÜRST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen eqüino.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- 23)GRAHAM, J.K. **Cryopreservation of stallion spermatozoa.** Veterinary Clinics of North America: Equine Practice, v. 12, p. 131-147, 1996.
- 24)HOCHACHKA, P. W.; **Maintaining coupled metabolism-membrane functions in hipoxia adaptation of diving mammals.** FASEB J 46(6): 22382238, May 1, 1987.
- 25)HOLT, W. V. **Basic aspects of frozen storage of semen.** Animal Reproduction Science, v.62, p.3-22, 2000.

- 26) JULIANI, G.C. et al. **Efeitos do glicerol, etilenoglicol, acetamida e leti desnatado na criopreservação de espermatozoides equinos.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 60, n 5, 2008.
- 27) KEITH, S.L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa.** Dissertação (Doutorado) – Colorado State University, 1998.
- 28) MAZUR, P. **Cryobiology: The freezing of biological systems.** Science, v.199, p.939- 949, 1970.
- 29) MAZUR, P. **Freezing of living cells mechanisms and implications.** American Journal of Physiology, v. 247, p. 251-272, 1984.
- 30) MEDEIROS, C.M.O. et al. **Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?** Theriogenology, v. 57, p. 327-344, 2002.
- 31) MEDEIROS, A.S.L. **Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade do sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores.** Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.
- 32) MERYMAN, et al. **Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection.** Cryobiology, v.14, p.287-302, 1977.
- 33) MOUSSA, M. et al. **Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen.** Theriogenology, v. 57, p. 1695-1706, 2002.
- 34) MOTTA, F.F. **Diluentes INRA para criopreservação do sêmen equino.** Trabalho de conclusão de curso (Graduação), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, 2010.
- 35) NOGUEIRA, M.B.R. **Uso de diluição seriada de sêmen criopreservado na inseminação artificial em tempo fixo em éguas Mangalarga Marchador.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- 36) OLIVEIRA, G.C. et al. **Criopreservação do sêmen equino: uma revisão.** Revista Brasileira de Reprodução animal, v. 37, n.1, p. 23-28, 2013.
- 37) PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. **Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes.** Theriogenology, v.38, p.209-222, 1992.
- 38) SNOECK, P.P.N. et al. **Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen equino.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 59, n. 1, 2007.

- 39) SILVA FILHO, J. M. **Aspects of the reproductive handling and of the semen in the artificial insemination in mares.** Thesis (Doctor Scientiae) –Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1994.
- 40) TERRACIANO, P.B. et al. **Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial.** *Ciência Rural*, v. 38, n 7, 2008.
- 41) TISCHNER, M. **Analysis of the pattern of ejaculation in stallions.** *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 41, p. 329-335, 1974.
- 42) YILDIZ, C. et al. **Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing.** *Theriogenology*, v. 54, p. 579-585, 2000.
- 43) WATSON, P. F. **The effects of cold shock on sperm cell membranes.** New York Academic Press, p. 189-218, 1981.
- 44) WATSON, P. F. **Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function.** *Reproduction and Fertility Development*, v.7, p.871-891, 1995.
- 45) WATSON, P. F. **The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.** *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 481-492, 2000.
- 46) ZIMMERMANN, M.F. **Efeito da diluição do crioprotetor dimetilformamida de amostras em sêmen equino descongeladas utilizando-se dois diluentes comerciais.** Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília – UnB/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.