UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS CRIOPROTETORES GLICEROL E METILFORMAMIDA SOBRE A VIABILIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN EQÜINO

HEDER NUNES FERREIRA

BOTUCATU – SÃO PAULO
Jun/2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS CRIOPROTETORES GLICEROL E METILFORMAMIDA SOBRE A VIABILIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN EQÜINO

HEDER NUNES FERREIRA

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Botucatu para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária. Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Adj. Dr. Marco Antonio Alvarenga

BOTUCATU – SÃO PAULO
Jun/2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Ferreira, Heder Nunes.
Efeito da exposição aos crioprotetores glicerol e metilformamida sobre a viabilidade e fertilidade do sêmem equino / Heder Nunes Ferreira. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2008.
Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga
Assunto CAPES: 50504002

1. Reprodução animal. 2. Inseminação artificial. 3. Equino.

CDD 636.0824

Palavras chave: Congelação; Criopreservação; Crioprotetores; Garanhão; Sêmen.

Nome do Autor: Heder Nunes Ferreira

Título: EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS CRIOPROTETORES GLICEROL E METILFORMAMIDA SOBRE A VIABILIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN EQÜINO

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

_____

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

_____

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVZ – USP – São Paulo

Data da Defesa: 25 de junho de 2008.

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares,
em especial, a minha mãe Dizzy e meu padrasto Alfredo, que sempre acreditaram em mim.

A todos os profissionais relacionados à Medicina Veterinária.

AGRADECIMENTOS

Como foi chegar aqui sozinho? Este caminho não foi de solidão, mas sim de muito apoio, amor e compreensão e, em certas horas, de superação. Portanto rendo homenagens às pessoas que participaram desta minha conquista, pois estarão sempre presentes em minha história.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga, mais do que um orientador, foi um verdadeiro sinalizador que, com sabedoria e paciência soube me conduzir nos ensinamentos necessários.

Ao meu amigo Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa, pela co-orientação e, especialmente, pelo entusiasmo contagiante com que transmite aos alunos os seus conhecimentos.

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

Ao Prof. Dr. José Nicolau P. Puoli Filho, pela abertura da Fazenda Edgárdia para execução do teste de fertilidade deste projeto.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Coutinho da Silva, família e amigos, pelo grande apoio e ensinamento a mim concedido durante minha permanência na Universidade de Cornell.

Aos meus amigos, Daniel, Gabriel, Coruja, Zé Dell'Aqua, Marcio, Vivi, Bruna, Ieda, Guta, Cássia, Daniela, Fernanda, Gustavo, Carla, Cely, Duroc, André, cujas experiências compartilhadas resultaram em valiosas contribuições.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução, Edilson, Maria Cristina, Valter, Márcio, Miguel, pela cooperação na realização deste projeto.

Aos funcionários da Fazenda Edgárdia, Dito, Tamiro e João, pela grande colaboração no manejo das éguas utilizadas neste projeto.

E a Deus, por ser tão generoso, me brindando com todas estas pessoas, que com amor e dedicação sempre iluminaram o meu caminho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS vii

LISTA DE TABELAS viii

ABSTRACT xii

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 3

2.1. Comportamento das células espermáticas frente ao processo de congelação 3

2.2. Agentes crioprotetores não penetrantes 4

2.2.1. Açúcares 5

2.2.2. Gema de ovo 5

2.2.3. Proteínas do leite 6

2.3. Agentes crioprotetores penetrantes 6

2.3.1. Glicerol 7

2.3.2. Etilenoglicol 7

2.3.3. Dimetilsulfóxido (DMSO) 8

2.3.4. Amidas 8

2.4. Principais crioprotetores utilizados na congelação de sêmen de garanhões 8

3. OBJETIVOS 16

4. MATERIAIS E MÉTODOS 17

4.1. EXPERIMENTO I: Estudo da estabilização com diferentes concentrações de metilformamida e glicerol sobre a viabilidade do sêmen pré e pós congelação 17

4.1.1. Animais 17

4.1.2. Colheita de sêmen 17

4.1.3. Manipulação do sêmen 17

4.1.4. Análises laboratoriais com sêmen a fresco 18

4.1.5. Análises laboratoriais com sêmen diluído 18

4.1.6. Adição dos crioprotetores 19

4.2. EXPERIMENTO II: Avaliação do efeito contraceptivo dos crioprotetores glicerol e metilformamida. 21

4.2.1. Animais 21

4.2.2. Colheita do sêmen 21

4.2.3. Análises laboratoriais 21

4.2.4. Processamento das amostras 21

4.2.5. Controle do desenvolvimento folicular e indução da ovulação 23

4.2.6. Inseminação artificial 23

4.2.7. Diagnóstico de gestação 23

4.3. Análise Estatística 23

5. RESULTADOS 24

5.1. EXPERIMENTO I: Estudo da estabilização com diferentes concentrações de metilformamida e glicerol sobre a viabilidade do sêmen pré e pós congelação 24

5.2. EXPERIMENTO II: Avaliação do efeito contraceptivo dos crioprotetores glicerol e metilformamida 38

6. DISCUSSÃO 39

7. CONCLUSÃO 45

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

C – Celsius

DMSO – Dimetilsufóxido

GL – Glicerol

DMF – Dimetilformamida

EG – Etilenoglicol

MF – Metilformamida

Contr. - Controle

M – Molar

MT – Motilidade total

MP – Motilidade progressiva

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

LIN – Linearidade

STR – Índice retilíneo

RAPID – Percentual de espermatozóides rápidos

FITC-PSA - Glutinina de *Pisum sativum* Conjugada a Isotiocianato de Fluorescência

JC-1 - Iodeto de 5,5',6,6'–tetracloro–1,1,3,3'–tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mg – Miligrama

seg. – Segundos

min. - Minutos

CASA - Computer-Assisted Semen Analyzes

IMP – Integridade de membrana plasmática

IAC – Integridade de membrana acrossomal

PMM – Potencial de membrana mitocondrial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros, motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10) na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-estabilização. 26

Tabela 2 – Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros 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), velocidade espermática real (VCL), linearidade (LIN), índice retilíneo (STR), percentual de espermatozóides rápidos (RAPID), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10), na comparação dos diferentes tratamentos estudados pós-estabilização. .**Error! Bookmark not defined.**

Tabela 3 - Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros integridade de membrana plasmática (IMP), integridade de membrana acrossomal (IAC) e potencial de membrana mitocondrial (PMM), avaliado através do microscópio de epifluorescência, na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-estabilização. 30

Tabela 4 - Médias e desvios padrão do sêmen, referentes aos parâmetros motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10) na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-descongelação..... 32

Tabela 5 – Médias e desvios padrão do sêmen referentes aos parâmetros 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), velocidade espermática real (VCL), linearidade (LIN), índice retilíneo (STR), percentual de espermatozóides rápidos (RAPID), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10), na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-descongelação... 34

Tabela 6 – Médias e desvios padrão do sêmen, referentes aos parâmetros integridade de membrana plasmática (IMP), integridade acrossomal (IAC) e potencial mitocondrial (PMM), avaliado pelo microscópio de epifluorescência na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós congelação..... 36

Tabela 7 - Percentual de fertilidade por garanhão e total, após o período de estabilização (5°C / 1 hora) utilizando os grupos Contr., MF 3% (metilformamida 3%) e GL 3% (glicerol 3%). 38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros, motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10) na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-estabilização. 27

Figura 2 – Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros 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), velocidade espermática real (VCL), linearidade (LIN), índice retilíneo (STR), percentual de espermatozóides rápidos (RAPID), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10), na comparação dos diferentes tratamentos estudados pós-estabilização. 29

Figura 3 – Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros integridade de membrana plasmática (IMP), integridade de membrana acrossomal (IAC) e potencial de membrana mitocondrial (PMM), avaliado através do microscópio de epifluorescência, na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-estabilização. 31

Figura 4 – Médias e desvios padrão do sêmen, referentes aos parâmetros motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10) na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-descongelação..... 33

Figura 5 – Médias e desvios padrão do sêmen referentes aos parâmetros 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), velocidade espermática real (VCL), linearidade (LIN), índice retilíneo (STR), percentual de espermatozóides rápidos (RAPID), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10), na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-descongelação... 35

Figura 6 - Médias e desvios padrão do sêmen, referentes aos parâmetros integridade de membrana plasmática (IMP), integridade acrossomal (IAC) e potencial mitocondrial (PMM), avaliado pelo microscópio de epifluorescência na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós congelação..... 37

Figura 7 – Percentual de fertilidade por garanhão e total, após o período de estabilização (5℃ / 1 hora) utilizando os grupos Contr., MF 3% (metilformamida 3%) e GL 3% (glicerol 3%). 38

FERREIRA, H.N. **Efeito da exposição aos crioprotetores glicerol e metilformamida sobre a viabilidade e fertilidade do sêmen eqüino**. Botucatu, 2008. 64p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

RESUMO

O processo de congelação e descongelação de sêmen induz a diversos efeitos deletérios na célula espermática. Crioprotetores são adicionados aos meios de congelação para minimizar esses danos, entretanto altas concentrações dessas substâncias aumentam sua toxicidade e, conseqüentemente, diminui a fertilidade. É importante o equilíbrio entre habilidade crioprotetora e toxicidade desses componentes. As amidas têm se mostrado um crioprotetor de baixa toxicidade, especialmente para garanhões de má congelabilidade e para outras espécies de animais. O presente estudo objetivou determinar a viabilidade e o efeito contraceptivo dos crioprotetores glicerol (GL) e metilformamida (MF) para congelação de sêmen de garanhões. EXPERIMENTO I: Foi colhido o sêmen de 10 garanhões com uma vagina artificial, diluído (1:1) em meio à base de leite (Botu-sêmen®) e centrifugado (600xg/10min). Foram ressuspendidos os *pellets* com meio de congelação (INRA82) contendo três concentrações diferentes de GL (2, 3 e 4,5%) e MF (2, 3 e 4,5%) e um grupo controle (Contr.) sem adição de crioprotetor, na concentração de $100x10^6$ espermatozóides/mL. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL, resfriado a 5°C/1hora e mantido em vapor de nitrogênio durante 15 minutos e daí imerso em nitrogênio líquido. As amostras foram avaliadas após o período de estabilização (5°C/1hora) bem como após a descongelação (46°C/20seg) pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10). Foram avaliados parâmetros de motilidade, e através de Microscopia de Fluorescência, foi avaliada a integridade de membranas (plasmática e acrossomal) e potencial da membrana mitocondrial. A análise estatística foi realizada por ANOVA e teste de Tukey com significância de 5%. No período pós-estabilização a única diferença observada foi no parâmetro de motilidade progressiva, onde o grupo MF2% (25,7%) foi superior ($p<0,01$) ao Contr. (13,5%). Pós-congelação o parâmetro motilidade total não apresentou diferença dentro dos grupos, entretanto quando comparados os crioprotetores

houve diferença significativa favorável a MF (3,7^{d}; 33,4^{abc}; 44,2^{ab}; 50,9^{a}; 20,6^{cd}; 26,3^{bc} e 23,4^{bcd}, respectivamente para Contr., 2, 3 e 4,5% de MF e 2, 3 e 4,5% de GL). Para o parâmetro motilidade progressiva não houve diferença entre os dois crioprotetores, pós-congelação. Para o parâmetro RAPID, não houve diferença dentro dos grupos. Entretanto quando comparados os crioprotetores houve diferença significativa, sendo MF superior em algumas concentrações (1,5^{c}; 22,5^{ab}; 29,4^{ab}; 32,6^{a}; 12,2^{bc}; 16,6^{abc} e 13,7^{bc}, respectivamente para Contr., 2, 3 e 4,5% de MF e 2, 3 e 4,5% de GL). Na avaliação da integridade das membranas e potencial mitocondrial não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. EXPERIMENTO II: Entre os 10 garanhões do experimento I, foram utilizados dois deles para a avaliação do efeito contraceptivo através do teste de fertilidade, sendo que o processamento do sêmen foi similar ao do experimento I. Foram inseminadas um total de 48 éguas, divididas em três grupos (Contr., MF3% e GL3%), sendo 8 éguas para cada garanhão. As inseminações foram realizadas num intervalo de 36 a 48 horas após a indução da ovulação, depois do período de estabilização de 1hora, a 5°C. A dose inseminante foi de 500 milhões de espermatozóides totais e o diagnóstico de gestação foi realizado após 15 dias da ovulação, com o auxílio da ultra-sonografia. A análise estatística foi feita através do teste Exato de Fisher com o nível de significância de 5%. Não foi observada diferença significativa entre os grupos avaliados (56,25; 43,75 e 50%, respectivamente para Contr., MF3% e GL3%), nem mesmo entre os garanhões utilizados. Portanto, com base nos resultados do presente experimento, pode-se concluir que tanto GL como MF, em todas as concentrações estudadas, não apresentaram efeito deletério à célula espermática durante o período de estabilização. O crioprotetor MF foi superior ao GL na habilidade de proteger a célula espermática durante o processo de congelação. Concluí-se, também, que as três concentrações estudadas, de ambos os crioprotetores, foram adequadas para a proteção das crioinjúrias.

Palavras chave: Sêmen congelado, crioprotetor, garanhão

FERREIRA, H.N. **Effect of exposition to the cryoprotector glycerol and methylformamide on the viability and fertility of the equine semen.** Botucatu, 2008. 64p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho".

ABSTRACT

The frozen thawing semen process induce several damages on sperm cells. The use of cryoprotectors is fundamental to protect the spermatozoa from frozen-thawing damage, however high concentrations of these compounds can decrease the fertility. It is very important to balance the ability to cryoprotect with cryoprotector toxicity. Amidas has been shown to have a low toxicity specially for bad freezer stallions and some other species. The present experiment aimed to determine the effect of exposition on glycerol (GLY) and methylformamida (MF) over viability and fertility of stallion semen. On experiment I one ejaculated from 10 stallions was collected and diluted (1:1) in skim milk extender (Botu-sêmen®) and centrifuged (600g/10min). The sperm pellets were resuspended with a frozen extender (INRA82) containing 3 different concentrations of GLY (2, 3 or 4,5%) and MF (2, 3 or 4,5%) and a control group. (Contr.) using a concentration of de $100x10^6$ esperm/mL. Semen was packaged in 0,5mL straws, cooled at a 5℃/1hour, maintained over nitrogen and finally frozen. The motility parameters were evaluated after stabilization (5℃/1hour) and again after frozen thawing (46℃/20seg) by CASA (HTMA-IVOS-10). Membrane integrity (Plasmatic and Acrossomal) and mitochondrial potential of membrane were also evaluated using fluorescent probes. ANOVA and Tukey test were used for statistical evaluation. After the stabilization time the only parameter that was different was the progressive motility (PM) that was higher on MF2% group (25,7%) when compared with Control Group (13,5%). No differences ($p>0.05$) were observed on Total Motility (TM) when concentrations of the same cryoprotector were compared, however differences favorable to MF were detected when comparisons were performed

between the groups (3,7^{d}; 33,4^{abc}; 44,2^{ab}; 50,9^{a}; 20,6^{cd}; 26,3^{bc} or 23,4^{bcd}, respectively for Contr., 2, 3 or 4,5% de MF and 2, 3 or 4,5% of GL). No differences were observed on PM between GL e MF. For the percentual of Rapid Cells differences were observed only between concentrations of the same cryoprotector (1,5^{c}; 22,5^{ab}; 29,4^{ab}; 32,6^{a}; 12,2^{bc}; 16,6^{abc} or 13,7^{bc}, for Contr., 2, 3 or 4,5% de MF and 2, 3 or 4,5% de GL, respectively). No differences on membrane integrity were observed between the experimental groups. A fertility trial was performed using two stallions. Semen was processed as described on experiment I using 3% of both cryoprotectors (MF and GL). After 1 hour of equilibration at 5°C a total of 48 mares were inseminated (16 for each Group). The inseminations were performed between 36 to 48 hours after ovulation induction using 500 million sperm per mare. Pregnancy diagnose was performed with 15 days after ovulation. No difference was observed on fertility rates (56,25; 43,75 or 50%, respectively for Contr., MF3% e GL3%). Based on results of this experiment we can concluded that no deleterious effect on sperm are induced by GL and MF at 2, 3 or 4,5% during the equilibration time before freeze. We can also concluded that these 3 concentrations were similar on the ability to protect the sperm cells during freezing and thawing, and that MF was superior than GL on the ability to protect the sperm cells from freezing damage.

Key words: Frozen semen, cryoprotector, stallion.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a “indústria do cavalo” possui destaque na economia de países desenvolvidos e em desenvolvimentos. Segundo o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – ESALQ – USP, no Brasil, essa agroindústria movimenta cerca de R$ 7,5 bilhões anuais, gerando aproximadamente 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos relacionados ao cavalo. Com isso, o país ocupa destaque internacional na eqüinocultura, estimulando investimentos no melhoramento genético e zootécnico do rebanho eqüino nacional.

A congelação de sêmen – umas das biotecnologias mais antigas relacionada à reprodução – tem contribuído para difusão de material genético de animais de interesse zootécnico.

Na eqüinocultura é cada vez mais crescente a utilização do sêmen congelado devido à liberação por grande parte das associações de criadores, sendo este interesse justificado pelas diversas vantagens que esta biotecnologia oferece, como: diminuição dos custos e riscos de acidentes no transporte dos animais; controle de doenças; transporte do sêmen de animais geneticamente superiores através de países e possibilidades da utilização de sêmen de garanhões que estejam participando de eventos, de doentes ou mesmo de já falecidos.

A despeito das vantagens apresentadas, existem desvantagens que precisam ser consideradas, sendo a principal a reduzida taxa de fertilidade obtida com o sêmen congelado-descongelado e a grande variação na resposta à congelação nesta espécie. São, também, diversos os fatores que concorrem contra o desenvolvimento da técnica de criopreservação do sêmen de garanhões. Dentre eles, a baixa resistência do sêmen de alguns indivíduos e raças ao processo de congelação, aliada à toxicidade do glicerol à célula espermática, além da não seleção genética pelo aspecto fertilidade na espécie eqüina.

O processo de congelação do sêmen provoca efeitos que alteram a sua homeostase e, na tentativa de evitar esses danos, são adicionadas ao meio de congelação substâncias denominadas crioprotetores, sendo que muitas vezes

esses se apresentam tóxicos para as células espermáticas, principalmente se estas forem expostas a uma concentração muito alta desses agentes.

Os crioprotetores são substâncias que podem ser divididos em duas classificações: os penetrantes que desempenham seu mecanismo de ação no meio extracelular e intracelular, e os não penetrantes que atuam somente no meio extracelular.

Agentes crioprotetores penetrantes são substâncias que desempenham um dos papeis mais importantes no processo de criopreservação, sendo que o glicerol é o crioprotetor mais utilizado na congelação de espermatozóides de garanhões. No entanto, já ficou evidenciado que esta substância é tóxica ao espermatozóide e, parte desta toxicidade, está relacionada a danos osmóticos que levam a uma queda nos índices de fertilidade.

Outras substâncias têm sido utilizadas como crioprotetor penetrante – as que pertencem ao grupo das amidas – mostrando-se bastante eficientes, principalmente para garanhões considerados de baixa congelabilidade como os das raças Mangalarga e Mangalarga Marchador.

Em função do acima apresentado o presente trabalho objetivou estudar a viabilidade e fertilidade de sêmen eqüino quando exposto aos crioprotetores glicerol e metilformamida. Sendo oportuno destacar que nenhum trabalho foi encontrado na literatura sobre a viabilidade e fertilidade do sêmen de garanhões previamente sujeito à congelação com metilformamida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Comportamento das células espermáticas frente ao processo de congelação

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.

Durante o processo de criopreservação do sêmen ocorrem várias situações de estresse para as células espermáticas, entre elas: grandes variações de temperaturas, exposição a temperaturas não fisiológicas, estresse osmótico devido a expressivas concentrações de solutos existentes nos meios utilizados para a criopreservação e, pela formação e dissolução de cristais de gelo formados no meio extracelular. Situações, estas que irão comprometer a viabilidade das células espermáticas. (Watson, 2000)

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.

No entanto, Amann & Pickett (1987) afirmam que quando o sêmen é resfriado a temperaturas abaixo de 0ºC ocorre a formação de cristais de gelo no meio extracelular, resultando em um aumento na concentração de sais neste fluido e favorecendo a saída de água do meio intracelular para o extracelular, levando à desidratação progressiva do espermatozóide, o que pode resultar em altas concentrações intracelulares de soluto, sendo assim, deletério à célula.

Em Mazur (1980) observa-se que numa curva de resfriamento muito rápida (>60^{o}C/min.) a água não tem tempo hábil de sair da célula e, em algum ponto abaixo de –10^{o}C, a célula sofrerá a congelação interna. As extensões dos danos causados pelo gelo intracelular dependem do grau de formação deste e do tamanho dos cristais. Grandes cristais podem causar danos mecânicos à célula, enquanto que os pequenos podem não ser deletérios, no

entanto, se reaquecidos, o crescimento destes pequenos cristais, em decorrência da recristalização, pode vir a causar danos severos.

Durante a descongelação a sobrevivência dos espermatozóides está relacionada à habilidade dos mesmos em passar novamente pela faixa crítica de temperatura. A curva preferencial de aquecimento depende do método em que o sêmen foi congelado. Se a congelação for lenta, a descongelação deve também ser lenta para permitir a descongelação dos cristais de gelo extracelulares, provocando a diluição do soluto e, lentamente, a re-hidratação das células. Se o sêmen for descongelado muito rapidamente, os cristais extracelulares descongelam-se na mesma velocidade e a água do meio invade muito bruscamente a célula, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática. Outrossim, se o sêmen foi congelado rapidamente os espermatozóides não sofrerão desidratação e, portanto, quando o gelo extracelular derreter não haverá influxo rápido de água através da membrana celular. Este sêmen também deve ser descongelado rapidamente, de modo que o gelo intracelular que se formou durante a congelação não tenha tempo de re-cristalizar. (Amman e Pickett, 1987)

2.2. Agentes crioprotetores não penetrantes

Os agentes crioprotetores não penetrantes são representados por macromoléculas com alto peso molecular, tais como os açúcares, a lipoproteína da gema do ovo, as proteínas do leite e alguns aminoácidos.

Amann & 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.

2.2.1. Açúcares

De acordo com Holt (2000) os açucares 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.

Amann & Pickett (1987) mostram os açucares utilizados em combinações de dois ou três, e seu mecanismo de ação baseia em efeitos osmóticos sobre os espermatozóides, ou seja, cria um ambiente hiper osmótico que faz com que a água contida nos espermatozóides saia para o meio extracelular, prevenindo, assim, a formação de cristais de gelo no interior das células.

Dalimata & Graham (1997) informam que os dissacarídeos, tais como, trealose e sucrose, interagem com os grupos polares da membrana promovendo uma estabilização da membrana espermática.

Estas interações envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxilas dos açucares com os grupos fosfatos dos fosfolipídios da membrana. Pela reposição da água ao redor das “cabeças” dos grupos de fosfolipídios os açucares podem prevenir os danos causados à membrana pela intensa desidratação. (De Leeuw *et al.,* 1993)

2.2.2. Gema de ovo

A gema de ovo no meio diluente de criopreservação beneficia os espermatozóides ao manter a pressão coloidal 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 à congelação de sêmen e concluiu que os efeitos crioprotetores da gema de ovo estão envolvidos com a porção lipoprotéica (lecitina) de baixa densidade, 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.

Aires *et al.* (2003); Gil *et al*. (2003) apresentam que a lecitina de origem vegetal (soja) tem sido utilizada com sucesso em sêmen de outras espécies, como bovinos e ovinos, na tentativa de substituir a gema de ovo.

2.2.3. Proteínas do leite

As proteínas do leite exercem um papel na criopreservação, semelhante a 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 & Maxwell, 2000)

Visando determinar os constituintes do leite responsáveis pela proteção dos espermatozóides durante o processo de criopreservação estudou-se os efeitos dos componentes, fosfocaseinato, α-lactoalbumina, β-lactoglobulina e proteínas do soro do leite em comparação aos meios diluentes INRA82, leite desnatado em suas diversas formas (UHT, desnatado, microfiltrado e ultra filtrado). Neste estudo verificou-se que o fosfocaseinato foi o componente do leite mais eficiente em manter a sobrevivência dos espermatozóides de garanhões armazenados a 4℃, sendo, também, superior em relação ao INRA82 quanto à fertilidade (60 e 36%, respectivamente). (Batellier *et al*. 1997)

2.3. 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 criam 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; Watson, 1979; Rowe, 1966; Dalimata & Graham, 1997)

Nash (1996) 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.

2.3.1. Glicerol

Silva *et al*. (2003) apresenta 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.

Os efeitos protetores do glicerol são representados por suas propriedades coligativas, pela diminuição do ponto de congelação e pela conseqüente redução das concentrações de eletrólitos na fração não-congelada da amostra, sendo que, inicialmente, ele ocasiona um estresse osmótico na célula espermática, impedindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares. (Watson, 2000).

Assim, Keith (1998), confirma o glicerol como o crioprotetor penetrante mais comumente utilizado nos meios de congelação de sêmen de garanhões em uma concentração que varia de 2 a 5%.

2.3.2. 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 e*t al.*, 2000)

2.3.3. Dimetilsulfóxido (DMSO)

Em soluções aquosas o DMSO apresenta em seu ponto eutético, interações com a molécula da água formando complexos nas proporções de 3 moléculas de água para 1 molécula de DMSO (3:1) e 2 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)

Em Kundu *et al*. (2000) 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 espermatozóides, promovendo certa proteção contra eventuais danos causados pela criopreservação.

2.3.4. Amidas

Ball & Vo (2001) dizem 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

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

2.4. Principais crioprotetores utilizados na congelação de sêmen de garanhões

Durante o processo de congelação os espermatozóides são expostos a várias situações adversas à homeostase, podendo ocasionar muitas injúrias celulares. A presença de algumas substâncias, tais como, açúcares, lipoproteínas da gema do ovo, proteínas do leite e determinados aminoácidos,

no meio diluidor alteram as propriedades físicas do processo de congelação da solução. (Viskanta *et al*., 1997; Wolfe & Bryant, 2001; Karow, 2006)

Em Holt (2000) tem-se que estas substâncias atuam como protetoras aos espermatozóides no processo de criopreservação quanto à formação de cristais de gelo intracelular, à desidratação excessiva da célula, aos danos osmótico e aos oxidativos.

Em trabalhos onde se estudou diluentes para congelação de sêmen de garanhões foi relatada a importância da interação entre as formulações de diluidores com substâncias criprotetoras, melhorando o desempenho da célula espermática nas avaliações laboratoriais e de fertilidade. Durante décadas, diluentes e seus constituintes têm sido estudados e testados na congelação de sêmen de garanhões com resultados bastantes variáveis em relação aos resultados laboratoriais de viabilidade espermática e índices de fertilidade. (Arruda, 2000; Papa *et al*. 1996; 1999)

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

Por outro lado, em Roasa *et al*. (2007) foram observadas variações na fertilização “in vitro” de oócitos eqüinos decorrente do meio utilizado para congelação; esta diferença foi relacionada ao nível de gema de ovo nos diluentes, ou seja, o sêmen congelado com o diluente com 21,5% de gema de ovo não resultou em fertilização e o meio diluente com 3% de gema de ovo apresentou uma taxa de fertilização de 15% ($p>0,05$). Entretanto, dentre os componentes dos diluentes de congelação, os agentes crioprotetores penetrantes, são as substâncias que desempenham um dos papeis mais importante no processo de criopreservação.

O glicerol é o crioprotetor penetrante mais utilizado nos meios de congelação, no entanto trabalhos têm demonstrado ser este crioprotetor tóxico

aos espermatozóides de diversas espécies. Estes efeitos tóxicos têm sido reportados por vários autores e amplamente revisados. (Fahy *et al.*, 1990)

A toxicidade do glicerol pode resultar em desnaturação de proteínas, alteração de interações da actina e indução da liberação das proteínas do seu local na membrana. Além disso, pode-se incluir: mudanças nos eventos citoplasmáticos devido o aumento da viscosidade intracelular, alteração da polimerização da tubulina, alteração da associação dos microtubulos, efeitos no balanço bioenergético, alteração direta da membrana plasmática e alteração do glicocálix e das proteínas superficiais da célula espermática. (Hammerstedt & Graham, 1992)

McLaughin *et al*. (1992); Curry (2000); Holt (2000) reportaram que o glicerol exerce efeitos tóxicos nos espermatozóides, como alterações físico-químicas que podem levar à ruptura da membrana plasmática, à remoção de importantes proteínas das membranas e a originar danos acrossomais.

Pace & Sullivan (1975) realizaram pesquisas com sêmen criopreservado eqüino e apontaram prejuízos à fertilidade quando é usado o glicerol como crioprotetor. Observou-se que as taxas de prenhêz de éguas foram mais altas quando inseminadas com sêmen fresco diluído sem glicerol (50%) do que com sêmen diluído 7% de glicerol (35%). Por outro lado, apurou-se um decréscimo acentuado da fertilidade de sêmen de garanhões refrigerados em meios diluentes contendo glicerol por um período de duas horas. (Demick *et al*.1976)

Também foi realizado um estudo inseminando éguas, após o período de estabilização (4°C/1 hora), utilizando o crioprotetor glicerol nas concentrações de 0; 2,2; 3,5 e 4,8%, onde se obteve resultados de prenhêz de 86,7; 53,3; 53,3 e 13,3%, respectivamente. Realizou-se inseminações em jumentas, com o sêmen de jumentos após o período de estabilização (4°C/1 hora), utilizando os crioprotetores glicerol (1,9%), dimetilformamida (2%), etilenoglicol (1,3%) e sem crioprotetor, obtendo-se como resultado de fertilidade 8, 67, 1,3 e 64%, respectivamente. (Vidament *et al*., 2008)

Constatou-se uma redução significativa nas características espermáticas de motilidade e viabilidade de membrana espermática pelo teste hiposmótico

em espermatozóides humanos congelados em meio diluente contendo 12% de glicerol em comparação a 8% de glicerol. (Panayota *et al*., 1998)

A exposição dos espermatozóides humanos num meio com glicerol por menos de 15 minutos causou redução na motilidade. Também conclui-se que a adição do glicerol no meio de congelação de sêmen de cães não promoveu nenhuma mudança no status acrossomal ou na motilidade, mas, resultou em declínio da ligação de espermatozóides em oócitos caninos. (Critiser *et al*., 1998; Hay *et al*., 1997)

Além desses estudos, o efeito da toxicidade do glicerol foi constatado e confirmado nos humanos, nos cães, nos galos, nos suínos e nos carneiros. (Panayota *et al*.; 1998; Critiser *et al*., 1998; Hay *et al*., 1997; Phillips *et al*.,1996; Murdoch & Jones, 1978; Fiser & Fair Full, 1990; Watson & Martin, 1975)

Na busca de crioprotetores alternativos foi estudada a eficiência *in vitro* do glicerol e etilenoglicol como agentes crioprotetores na congelação de espermatozóides de garanhões e constatou-se uma similaridade na motilidade e vigor entre os crioprotetores, havendo uma tendência de melhoria com a utilização do etilenoglicol. (Mercante *et al.*,1995)

Utilizou-se o glicerol e o etilenoglicol adicionados ao meio de congelação à base de Lactose-EDTA-gema de ovo, na concentração de 5%, na criopreservação de sêmen de garanhões, obtendo-se uma taxa de prenhêz de 37,5% para o grupo etilenoglicol e 12,5% para o grupo glicerol. Este resultado, no entanto, não foi significativo devido ao número restrito de fêmeas inseminadas. (Neves Neto *et al*.,1995)

Em outro estudo foram comparados os efeitos dos crioprotetores glicerol, etilenoglicol, dietilenoglicol, propilenoglicol e DMSO, e foi concluído que o etilenoglicol deprimiu a motilidade progressiva dos espermatozóides de garanhões pós-congelação, comparado com o glicerol ou DMSO e, os espermatozóides congelados com dietilenoglicol e propilenoglicol apresentaram baixa viabilidade e motilidade quando comparado aos outros crioprotetores. (Chenier *et al*., 1998)

Também em Landim-Alvarenga *et al.* (2001) foi relatado que o DMSO na concentração de 1,0 M foi menos efetivo ($p<0,05$) em relação ao glicerol na

concentração de 0,55M na mensuração de motilidade total e progressiva (25,8 e 12,6; 42,1 e 23,1% respectivamente) e similares para os resultados de viabilidade celular e integridade acrossomal.

Arruda (2000) diz que a elucidação de algumas dessas variações entre os crioprotetores estno estudo que evidencia uma interação entre o meio diluidor de congelação e o crioprotetor. Neste estudo foram utilizados os meios de congelação Lactose-EDTA-gema de ovo, INRA82 e meio à base de leite desnatado e os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. Quando se utilizou o meio Lactose-EDTA-gema de ovo os crioprotetores não apresentaram diferenças estatísticasi, contudo, com a utilização dos meios INRA82 e do meio diluente à base de leite desnatado, o etilenoglicol apresentou uma tendência à melhoria.

Na procura de outros crioprotetores alternativos para a congelação do sêmen eqüino várias formas de amidas (formamida, metilformamida, dimetilformamida, acetamida e metilacetamida) foram avaliadas como agentes crioprotetores em comparação com o glicerol. Resultou-se a metilformamida (0,9M), no momento 0 min., foi superior em manter a motilidade total e progressiva dos espermatozóides de garanhões pós-congelação, quando comparado ao glicerol 0,55M e, no momento 20 min pós-congelação a metilformamida (0,6M) também foi superior ao glicerol (0,55M) nos parâmetros de motilidade total e progressiva e na preservação da viabilidade celular. (Keith, 1998)

Alvarenga *et al*. (2000) estudaram a eficácia dos crioprotetores glicerol, etilenoglicol, DMSO e dimetilformamida e concluíram que o DMSO foi inferior nos resultados de motilidade total e progressiva em relação aos demais crioprotetores (42,1 e 23,1; 40,9 e 22,8; 25,8 e 12,6; 50,6 e 22,2%, respectivamente).

Por outro lado, em Keith (1998) os resultados de motilidade inferiores ao glicerol ($p<0,05$) foram obtidos utilizando-se os crioprotetores acetamida, metilacetamida, formamida, metilformamida, dimetilformamida na concentração de 0,55M (60, 8, 20, 5, 40 e 37%). No entanto, em um segundo experimento onde os crioprotetores etilenoglicol, metilformamida, dimetilformamida foram usados nas concentrações de 0,6M e 0,9M, em comparação ao glicerol a 0,6M,

o crioprotetor metilformamida a 0,9M obteve um resultado superior, quando comparado aos demais tratamentos ($p<0,05$), em relação à motilidade.

Foram avaliadas em Medeiros *et al*. (2002) várias formas de amidas na congelação de sêmen de garanhões em comparação com o glicerol e observou-se uma melhoria significativa no parâmetro de motilidade total com a utilização da dimetilformamida a 5% e a metilformamida a 5%, quando comparados ao glicerol 5%. A dimetilacetamida a 3% proporcionou melhores resultados de motilidade, progressiva em comparação aos outros crioprotetores e Gomes *et al*. (2002) afirmam que, em um trabalhando com sêmen de garanhões Mangalarga Marchador, também obteve-se resultados superiores de motilidade total e integridade de membrana com a utilização da metilformamida e dimetilformamida a 5% em comparação ao glicerol.

Alvarenga (2003) estudou as variações de congelabilidade entre raças utilizando os crioprotetores dimetilformamida a 5% e glicerol a 5%. Constatou-se que, num universo de 55 garanhões de diferentes raças, os parâmetros de motilidade total e progressiva foram superiores em relação à dimetilformamida, na maioria dos garanhões (40 de 55 indivíduos).

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

Já, Vidament *et al*. (2002) diz que não foram observadas diferenças em relação à taxa de fertilidade por ciclo em éguas inseminadas com sêmen pós-congelação, quando utilizados como crioprotetor o glicerol nas concentrações de 2 e 3% e dimetilformamida a 2% (46, 58, 50% respectivamente); porém, neste trabalhos foram utilizados garanhões de alta congelabilidade.

Os mesmos autores, num estudo seguinte (2005) comprovaram que concentrações finais maiores que 3,5% de glicerol no sêmen possuem efeitos contraceptivos causando queda nos índices de fertilidade. Neste estudo foram comparadas diversas concentrações de glicerol (0; 2,5; 4 e 5,5%), adicionadas ao meio INRA82 + 2% gema de ovo e refrigerado na temperatura de 4℃ por 1

hora e 15 minutos, antes das inseminações. Como resultado de fertilidade obteve-se as seguintes taxas de prenhêz: 13/15; 8/15; 8/15; 2/15, elucidando que, quanto maior a concentração de glicerol, menor a taxa de fertilidade.

Medeiros (2003) realizou-se inseminações em 30 éguas utilizando-se o sêmen congelado de um garanhão da raça Mangalarga Marchador. Quinze éguas foram inseminadas empregando-se como crioprotetor o glicerol e nas outras 15 foi usada a dimetilformamida. Nas inseminadas com glicerol não foi observada nenhuma égua prenha enquanto que nas inseminadas com a dimetilformamida a taxa de prenhêz foi de 40% (6/15).

Em estudo semelhante que foi desenvolvido na Universidade do Colorado nos EUA, Moffet *et al*. (2003) obtiveram uma taxa de prenhêz com a dimetilformamida de 47% (14/30), enquanto que, com o glicerol, a taxa foi de 14% (5/34).

Alvarenga *et al*., (2005) relatam que a característica dos crioprotetores à base de amidas de se adaptarem melhor como agentes crioprotetores ao sêmen de garanhões quando estes apresentam resultados insatisfatórios com o glicerol, pode estar relacionada à menor viscosidade das amidas em relação ao glicerol, resultando em uma maior permeabilidade deste crioprotetores e, portanto, diminuindo os riscos de estresse osmótico nas células espermáticas.

Também foi avaliada por Ball & Vo (2001) a tolerância osmótica do espermatozóide eqüino quanto à adição e remoção dos crioprotetores etilenoglicol, DMSO, propilenoglicol e glicerol, concluindo que a adição e a remoção do glicerol resultaram em um maior estresse osmótico caracterizado por uma redução de motilidade e diminuição da integridade celular e acrossomal, quando comparado aos outros crioprotetores avaliados.

Um experimento recente foi realizado por Medeiros (2007) com a intenção de avaliar a fertilidade dos espermatozóides de sêmen fresco de garanhões submetidos ao estresse osmótico com soluções hipersaturadas dos crioprotetores dimetilacetamida, metilformamida, dimetilformamida e glicerol na concentração de 1 Molar. Os resultados demonstraram que houve uma superioridade dos tratamentos com as amidas em relação ao tratamento de glicerol na preservação da motilidade e integridade de membrana, concluindo

que a diferença entre os crioprotetores pode estar relacionada ao fator permeabilidade das amidas na célula espermática, acarretando menores injurias. Neste mesmo experimento observou-se queda de fertilidade acentuada quando espermatozóides de um garanhão da raça Mangalarga Marchador foram expostos ao glicerol.

3. OBJETIVOS

1. Estudar o efeito da estabilização com diferentes concentrações de metilformamida e glicerol sobre a viabilidade do sêmen pré e pós congelação.

2. Determinar se os crioprotetores glicerol e metilformamida apresentam algum efeito deletério sobre a fertilidade do sêmen antes da congelação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. EXPERIMENTO I: Estudo da estabilização com diferentes concentrações de metilformamida e glicerol sobre a viabilidade do sêmen pré e pós congelação

4.1.1. Animais

Foram utilizados 10 garanhões, com idade entre 4 e 18 anos, das raças Mangalarga Marchador (3), Quarto de Milha (2), Puro Sangue Árabe (1), Mangalarga (2), Hannoveriano (2). Também foram realizadas colheitas de 2 ejaculados de cada animal, num total de 20 ejaculados.

4.1.2. Colheita de sêmen

O sêmen foi colhido com a utilização de uma vagina artificial (modelo Biotech Botucatu), usando a metodologia de colheita fechada, com a temperatura da vagina artificial em torno de 43°C e a utilização de uma égua em estro, devidamente contida ou um manequim, para que o garanhão efetuasse a monta.

4.1.3. Manipulação do sêmen

Realizada a colheita, o sêmen foi filtrado para descartar a fração gel do ejaculado e o volume foi mensurado em uma proveta graduada, sendo uma alíquota separada para a realização de exames laboratoriais com sêmen a fresco e a outra parte diluída na proporção de 1:1 com meio à base de leite Botu-sêmen®[1], sendo nesta parte, executados, posteriormente, os devidos tratamentos propostos na realização deste projeto.[2]

---

[1] Botu-sêmen® - Biotech Botucatu Ltda – Botucatu/SP.

[2] Vide ORGANOGRAMA 1; p.20, desta dissertação.

4.1.4. Análises laboratoriais com sêmen a fresco

A alíquota separada foi utilizada para avaliação de parâmetros da motilidade total sendo avaliada em microscópio de luz e, a concentração espermática foi realizada em microscópio de luz, com auxilio de uma câmara de Neubauer após diluição de 10µL de sêmen em 190µL de água deionizada (1:20).

Esfregaços foram realizados para a avaliação de morfologia espermática, após coloração de Karras modificada por Papa *et al*., (1999) e avaliados em microscopia de luz por imersão.

4.1.5. Análises laboratoriais com sêmen diluído

O restante do sêmen foi diluído na proporção de 1:1 com diluente à base de leite desnatado, sendo realizada uma análise computadorizada, com o equipamento Hamilton Thorne® (IVOS-10 Sperm Analyzer, Hamilton Thorne Biosciences Inc., Bervely, MA, USA) para avaliação os seguintes parâmetros espermáticos: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), 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), velocidade espermática real (VCL), linearidade (LIN), índice retilíneo (STR), percentual de espermatozóides rápidos (RAPID).

Também foi avaliada a integridade de membrana plasmática (Iodeto de Propídeo)[3], a integridade acrossomal (FITC-PSA)[4] e o potencial de membrana mitocondrial (JC-1)[5] segundo metodologia descrita por Celeghini *et al* (2007).

Posteriormente essa alíquota foi centrifugada por 10 min. a velocidade de 600xg, sendo o sobrenadante desprezado e restando o *pellet* que foi

---

[3] Iodeto de Propídeo – 28,707-5 – Sigma.

[4] FITC-PSA – L-0770 – Sigma.

[5] JC-1 – T3168 – Molecular Probes.

ressuspendido, com o meio INRA82(FR4)[6], obtendo-se uma concentração de 100 x 10^6 espermatozóides/mL.

4.1.6 Adição dos crioprotetores

A amostra ressuspendida foi dividida em sete grupos, sendo três grupos com adição do crioprotetor glicerol[7] na concentração final de 2, 3 e 4,5%, outros três grupos com adição do crioprotetor metilformamida[8] na concentração final de 2, 3 e 4,5% e um último sem a adição de crioprotetor servindo como controle. O sêmen foi envasado em palhetas francesas[9] de 0,5mL e submetido ao resfriamento de 5°C por 1 hora – período de estabilização utilizado na metodologia de congelação de sêmen de garanhões quando do uso de diluentes à base de leite.

Após o resfriamento de algumas palhetas, dos referidos grupos, estas foram avaliadas novamente pela análise computadorizada, sendo aferidos os mesmos parâmetros anteriormente descritos no item 4.1.5., assim como a análise de integridade de membrana plasmática, da membrana acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial.

As demais palhetas seguiram o processo de congelação, onde, no final deste foram descongeladas (46°C/20seg.) para a realização das avaliações computadorizadas e das avaliações de integridade da membrana plasmática, da membrana acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial.[10]

---

[6] FR4 – Nutricell – Campinas .

[7] Glicerol – G 4094 – Merk.

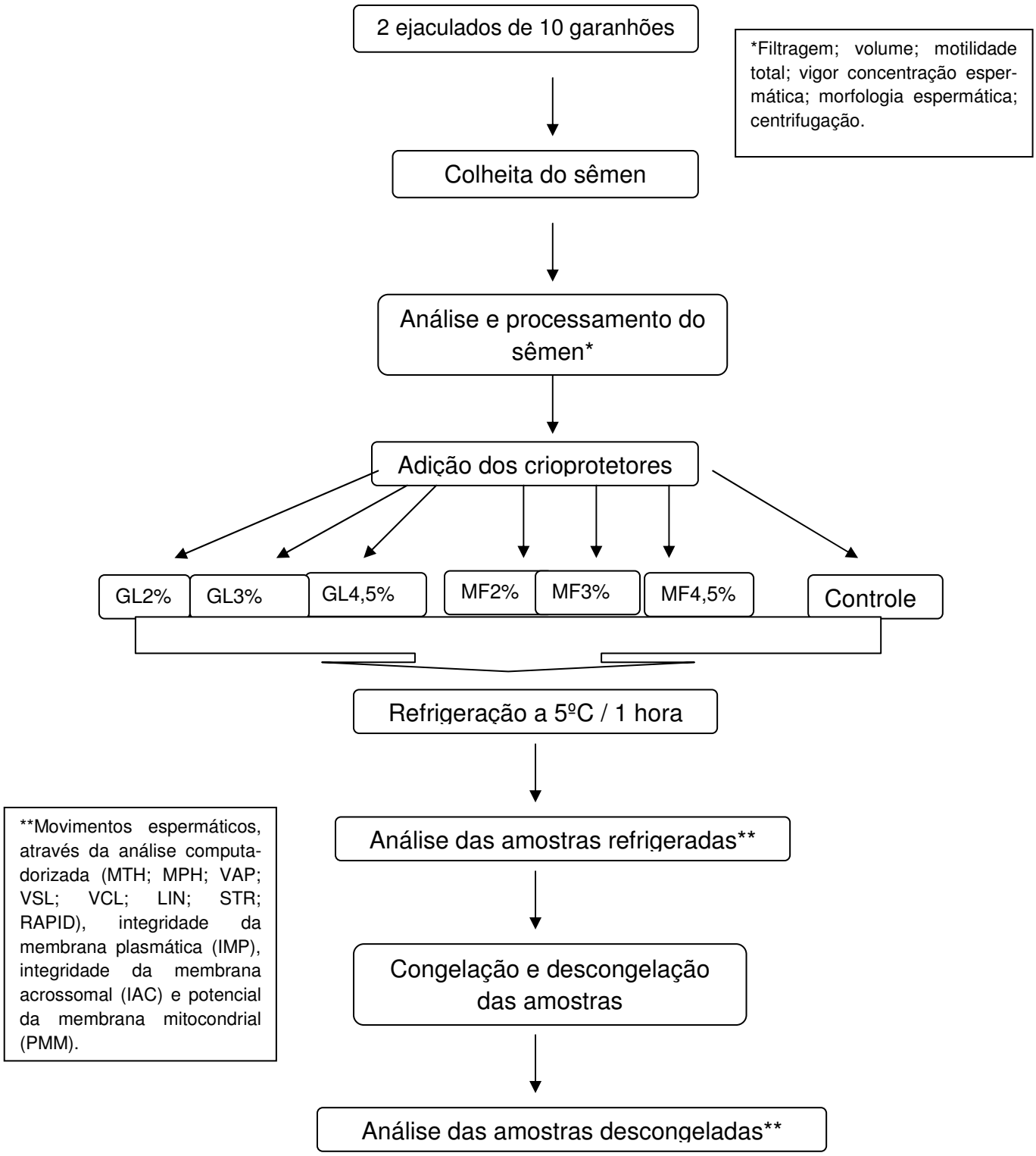
[8] Metilformamida – M 2769 – Sigma.

[9] Palhetas francesas – IMV Technologies.

[10] Vide ORGANOGRAMA 1; p.20, desta dissertação.

ORGANOGRAMA 1

Esquema simplificado da metodologia aplicada no EXPERIMENTO I.



4.2. EXPERIMENTO II: Avaliação do efeito contraceptivo dos crioprotetores glicerol e metilformamida.

4.2.1. Animais

Foram empregados 2 garanhões com fertilidade comprovada. Para cada garanhão foram utilizadas 8 éguas (n=16/grupo) de propriedade do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu, SP, com idade variando entre 5 e 16 anos e com histórico reprodutivo conhecido.

4.2.2. Colheita do sêmen

Os ejaculados foram obtidos conforme descrito no item 4.1.2 do EXPERIMENTO I.

4.2.3. Análises laboratoriais

As amostras de sêmen foram avaliadas conforme descrito nos itens 4.1.4 e 4.1.5 do Experimento I.

4.2.4. Processamento das amostras

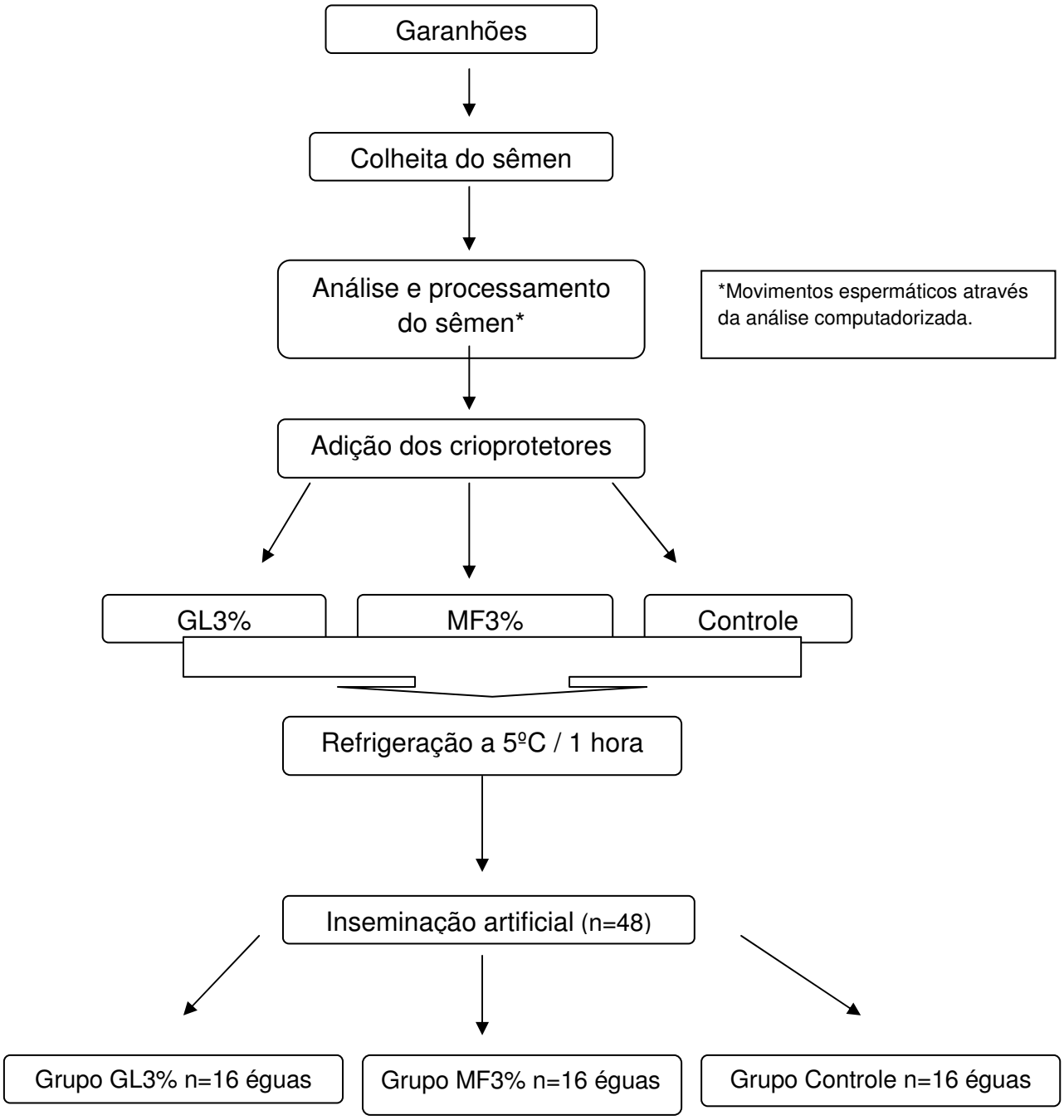
Com o sêmen centrifugado e já ressuspendido com o meio diluente FR4, obteve-se uma concentração de 50 milhões de espermatozóides viáveis por mL. Estes foram divididos em três grupos, sendo que, em dois deles, foram adicionados os crioprotetores glicerol e metilformamida na concentração de 3% e o terceiro como controle, sem adição de crioprotetor.

Após este procedimento, estes grupos passaram pelo resfriamento a 5°C por 1 hora e, em seguida, foram realizadas as inseminações[11].

[11] Vide ORGANOGRAMA 2; p.22, desta dissertação.

ORGANOGRAMA 2

Esquema simplificado da metodologia que será aplicada no EXPERIMENTO II



4.2.5. Controle do desenvolvimento folicular e indução da ovulação

As éguas foram submetidas à palpação retal bem como à avaliação ultra-sonográfica três vezes por semana e, quando em estro estas avaliações foram realizadas diariamente. Após detecção de um folículo de 35 mm de diâmetro associado à presença de edema uterino verificado através do ultra-som[12], os animais receberam uma aplicação intramuscular de 1 mg de desorelina para induzir a ovulação.

4.2.6. Inseminação artificial

A inseminação nas éguas foram realizadas de forma aleatória, com uma dose inseminante de aproximadamente de 500 milhões de espermatozóides, com a deposição do sêmen no corpo uterino, sendo estas realizadas depois de 36 horas e até 48 horas da indução de ovulação.

4.2.7. Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi feito 15 dias após a detecção da ovulação, por meio de ultra-sonografia e então aplicado 5mg de prostaglandina[13] $F_2\alpha$, intramuscular, para que os animais voltassem a ciclar.

4.3. Análise Estatística

Para as variáveis que apresentaram distribuição normal nas análises da movimentação espermática – obtidas pelo CASA – e integridade da membrana plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, foi utilizada a Análise de Variância para medidas repetidas, seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas. O nível de significância utilizado foi de 5%. Para verificação de diferenças entre os grupos estudados no teste de fertilidade, foi utilizado o teste Exato de Fisher e o nível de significância considerado também foi de 5%.

---

[12] Ultra-som – Aquila Vet - Pie Medical.

[13] Prostaglandina – Lutalyse – Fisher.

5. RESULTADOS

5.1. EXPERIMENTO I: Estudo da estabilização com diferentes concentrações de metilformamida e glicerol sobre a viabilidade do sêmen pré e pós congelação

No período pós-estabilização as avaliações realizadas pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10) nos parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva (Tabela 1 e Figura 1)[14], observou-se diferença significante somente para motilidade progressiva entre o grupo Contr. (13.5%) *versus* o grupo MF2% (25,7%). Para os demais parâmetros avaliados, não houve diferença estatística entre os grupos estudados (Tabela 2 e Figura 2)[15]. Para as avaliações de integridade de membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial os resultados também não diferiram estatisticamente (Tabela 3 e Figura 3)[16].

Para as avaliações realizadas com o sêmen descongelado, o parâmetro de motilidade total não apresentou diferença entre os grupos, quando utilizados os mesmos crioprotetores nas diferentes concentrações. Entretanto comparando-se os grupos em que foram utilizados diferentes crioprotetores (MF *versus* GL) e o grupo Contr., aos demais tratamentos, houve diferença significativa ($p<0,05$). O parâmetro de motilidade progressiva com o grupo Contr. se apresentou significativamente inferior ($p<0,05$) aos grupos da MF (0.9^{b}, $13,4^{a}$, 18^{a} e $18,3^{a}$, respectivamente para Contr., 2, 3 e 4,5% de MF), porém, não houve diferença entre os grupos utilizando GL e MF ($p>0,05$); (Tabela 4 e Figura 4)[17].

Para os parâmetros de VAP, VSL, VCL, STR o grupo Contr. se apresentou inferior aos outros grupos estudados ($p<0,05$). Para a avaliação de LIN, o controle foi inferior aos demais tratamentos, com exceção do grupo MF

[14] Vide p. 26 e 27, desta dissertação.

[15] Vide p. 28 e 29, desta dissertação.

[16] Vide p. 30 e 31, desta dissertação.

[17] Vide p. 32 e 33, desta dissertação.

4,5% que se apresentou semelhante a todos os grupos. Para o parâmetro RAPID, não houve diferença entre os grupos onde foram utilizados os mesmos crioprotetores. Entretanto, comparando-se estes grupos (MF *versus* GL) houve diferença significativa de $p<0,05$ ($1,5^{c}$, $22,5^{ab}$, $29,4^{ab}$, $32,6^{a}$, $12,2^{bc}$, $16,6^{abc}$ e $13,7^{bc}$, respectivamente para Contr., 2, 3 e 4,5% de MF e 2, 3 e 4,5% de GL); (Tabela 5 e Figura 5)[18].

Na avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal, e potencial mitocondrial, não houve diferença significativa entre os grupos estudados ($p>0,05$); (Tabela 6 e Figura 6)[19]

[18] Vide p. 36 e 37, desta dissertação.

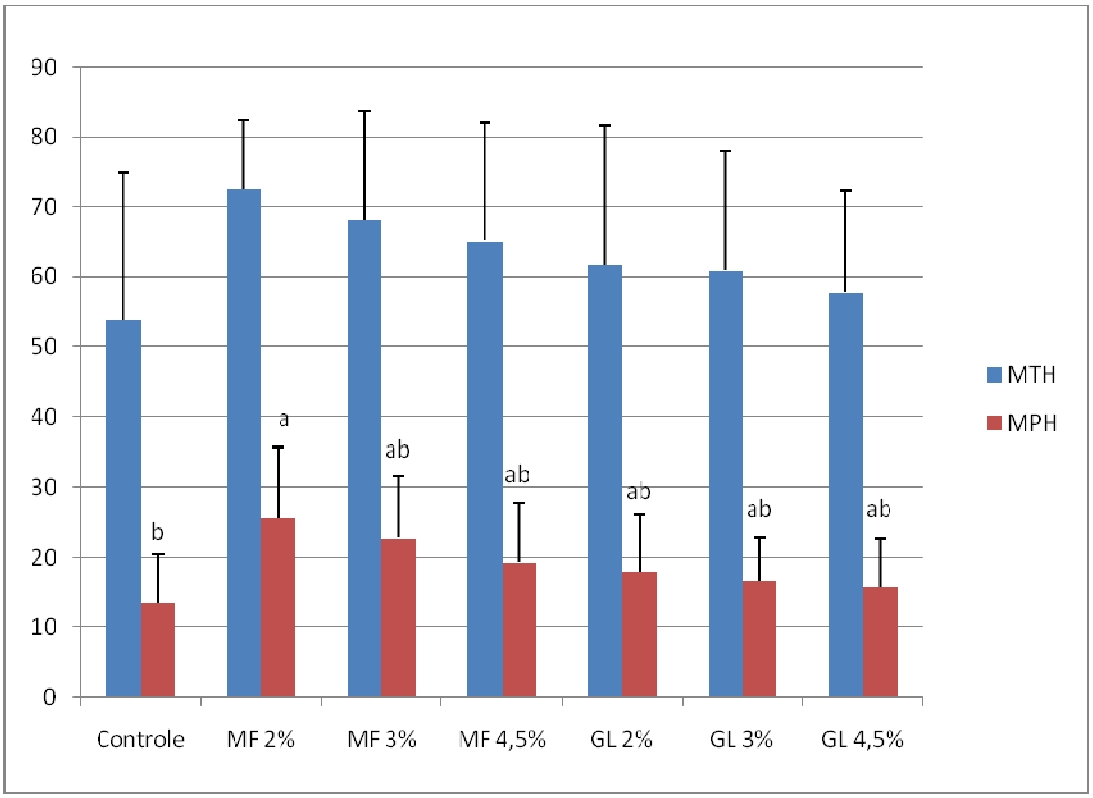
[19] Vide p. 38, desta dissertação.

Tabela 1 – Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros, motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10) na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-estabilização.

TRATAMENTO	PARÂMETROS (%)	
	MT	MP
CONTROLE	$53,9 \pm 21,4^{a}$	$13,5 \pm 7^{b}$
MF 2%	$72,5 \pm 9,9^{a}$	$25,7 \pm 10^{a}$
MF 3%	$68,1 \pm 15,6^{a}$	$22,8 \pm 8,9^{ab}$
MF 4,5%	$65,1 \pm 16,9^{a}$	$19,3 \pm 8,5^{ab}$
GL 2%	$61,7 \pm 20,0^{a}$	$17,9 \pm 8,2^{ab}$
GL 3%	$60,9 \pm 17,1^{a}$	$16,7 \pm 6,2^{ab}$
GL 4,5%	$57,8 \pm 14,6^{a}$	$15,7 \pm 6,9^{ab}$

MF 2% (metilformamida a 2%), MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2%), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).

Médias seguidas de mesma letra, dentro da mesma coluna, na comparação dos tratamentos para cada variável, não diferem estatisticamente. Valor de $p<0,01$.



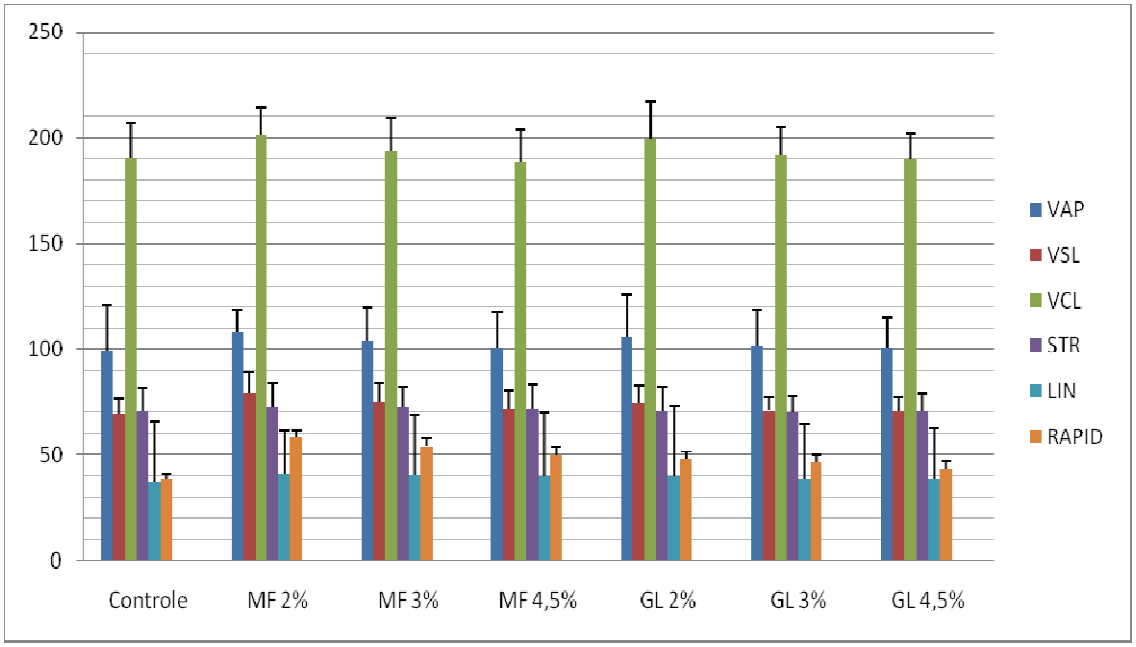
MF 2% (metilformamida a 2%), MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2%), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).

Figura 1 – Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros, motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10) na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-estabilização.

TABELA 2 - Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros 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), velocidade espermática real (VCL), linearidade (LIN), índice retilíneo (STR), percentual de espermatozóides rápidos (RAPID), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10), na comparação dos diferentes tratamentos estudados pós-estabilização.

TRATAMENTO	PARÂMETROS					
	VAP	VSL	VCL	STR	LIN	RAPID
CONTROLE	99,5 ± 16,7	69,4 ± 11,4	190 ± 28,4	70,4 ± 2,1	37,6 ± 1,8	38,7 ± 20,6
MF 2%	109 ± 12,6	79 ± 11,4	201 ± 20,8	72,7 ± 3,5	40,9 ± 3,2	58,5 ± 13,7
MF 3%	104 ± 14,9	75,1 ± 9,9	194 ± 28,2	72,5 ± 3,5	40,3 ± 2,5	54,2 ± 19,2
MF 4,5%	101 ± 15,8	72,2 ± 11,2	189 ± 30,2	72,1 ± 3,7	39,7 ± 3,1	50,1 ± 20,7
GL 2%	106 ± 18,1	74,6 ± 11,4	199 ± 33,7	70,7 ± 3,1	39,8 ± 4,0	48,3 ± 20,2
GL 3%	102 ± 13,5	71,3 ± 7,8	191 ± 26,1	70,1 ± 3,7	38,8 ± 2,0	46,5 ± 17,7
GL 4,5%	100 ± 12,7	70,5 ± 8,3	190 ± 24,2	70,6 ± 3,3	38,6 ± 2,1	43,6 ± 16,3

MF 2% (metilformamida a 2%), MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2 %), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).



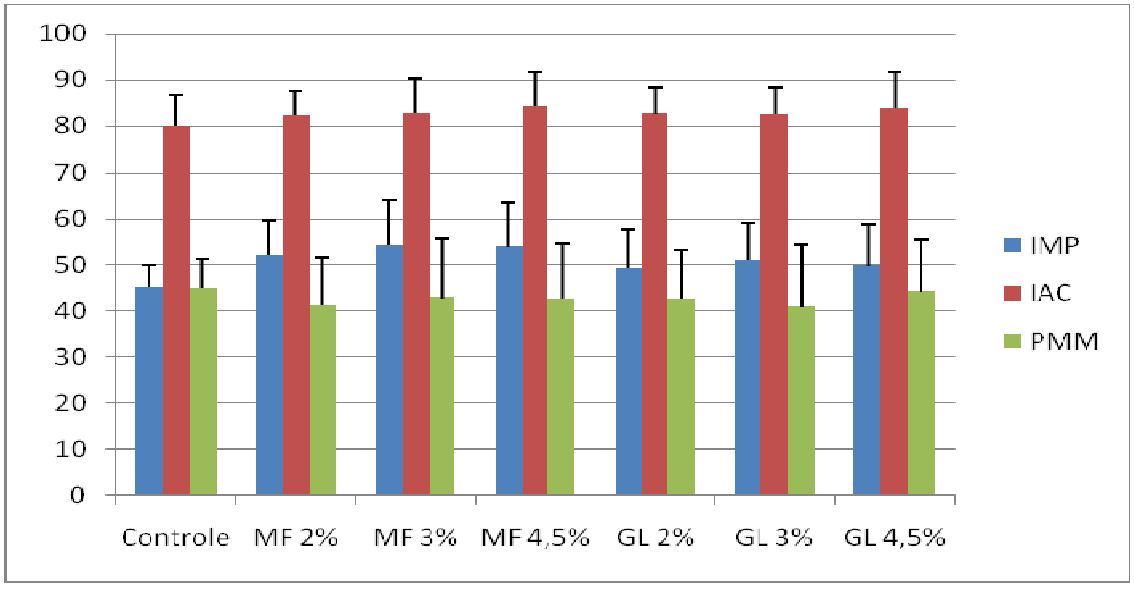
MF 2% (metilformamida a 2%), MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2%), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).

Figura 2 – Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros 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), velocidade espermática real (VCL), linearidade (LIN), índice retilíneo (STR), percentual de espermatozóides rápidos (RAPID), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10), na comparação dos diferentes tratamentos estudados pós-estabilização.

Tabela 2 - Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros integridade de membrana plasmática (IMP), integridade de membrana acrossomal (IAC) e potencial de membrana mitocondrial (PMM), avaliado através do microscópio de epifluorescência, na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-estabilização.

TRATAMENTO	PARÂMETROS (%)		
	IMP	IAC	PMM
CONTROLE	45,1 ± 4,9	79,9 ± 6,8	44,8 ± 6,4
MF 2%	52,1 ± 7,5	82,1 ± 5,3	41,3 ± 10,4
MF 3%	54,3 ± 9,7	82,8 ± 7,6	42,8 ± 12,9
MF 4,5%	53,9 ± 9,8	84,1 ± 7,7	42,6 ± 12,1
GL 2%	49,4 ± 8,2	82,6 ± 5,8	42,7 ± 10,6
GL 3%	51,1 ± 7,9	82,5 ± 5,9	40,9 ± 13,4
GL 4,5%	49,8 ± 9,1	83,9 ± 7,7	44,2 ± 11,4

MF 2% (metilformamida a 2%), MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2%), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).



MF 2% (metilformamida a 2%), MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2 %), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).

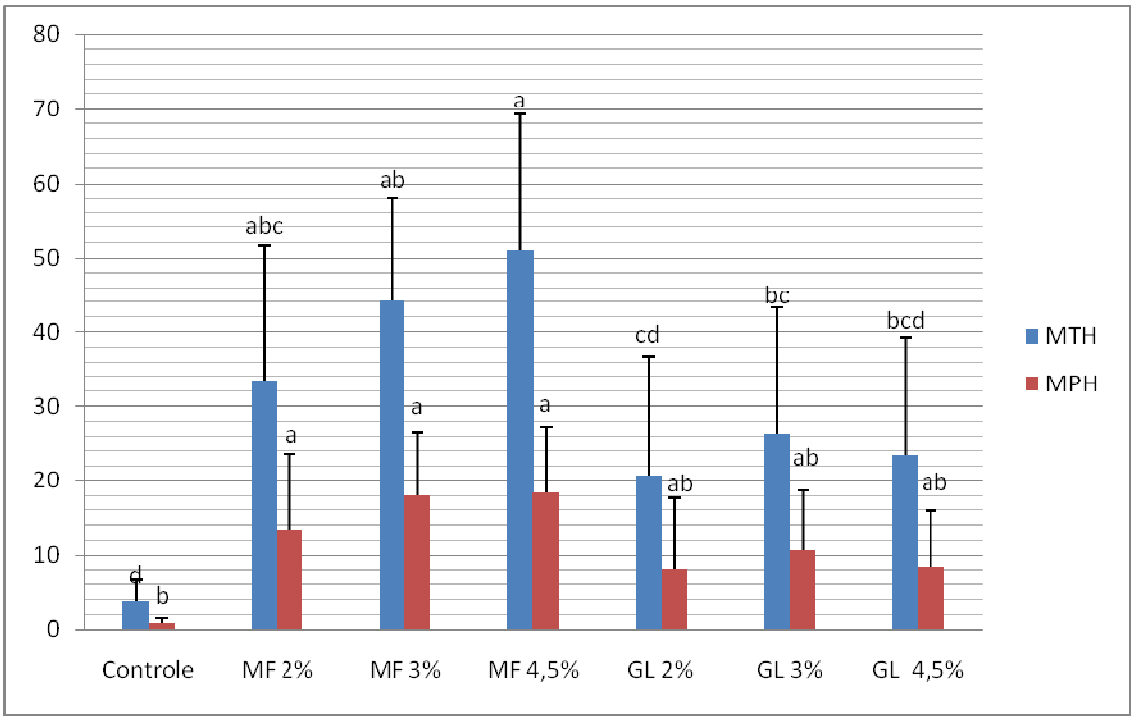
Figura 3 – Médias e desvios padrão referentes aos parâmetros integridade de membrana plasmática (IMP), integridade de membrana acrossomal (IAC) e potencial de membrana mitocondrial (PMM), avaliado através do microscópio de epifluorescência, na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-estabilização.

Tabela 3 - Médias e desvios padrão do sêmen, referentes aos parâmetros motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10) na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-descongelação.

TRATAMENTO	PARÂMETROS (%)	
	MT	MP
CONTROLE	$3,7 \pm 2,9^{d}$	$0,9 \pm 0,7^{b}$
MF 2%	$33,4 \pm 18,2^{abc}$	$13,4 \pm 10,3^{a}$
MF 3%	$44,2 \pm 13,9^{ab}$	$18 \pm 8,6^{a}$
MF 4,5%	$50,9 \pm 18,4^{a}$	$18,3 \pm 8,9^{a}$
GL 2%	$20,6 \pm 16,1^{cd}$	$8 \pm 9,7^{ab}$
GL 3%	$26,3 \pm 17,1^{bc}$	$10,7 \pm 8^{ab}$
GL 4,5%	$23,4 \pm 15,8^{bcd}$	$8,3 \pm 7,7^{ab}$

MF 2% (metilformamida a 2%), MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2%), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).

Médias seguidas de mesma letra, dentro da mesma coluna, na comparação dos tratamentos para cada variável, não diferem estatisticamente. Valor de $p<0,05$.



MF 2% (metilformamida a 2%), MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2 %), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).

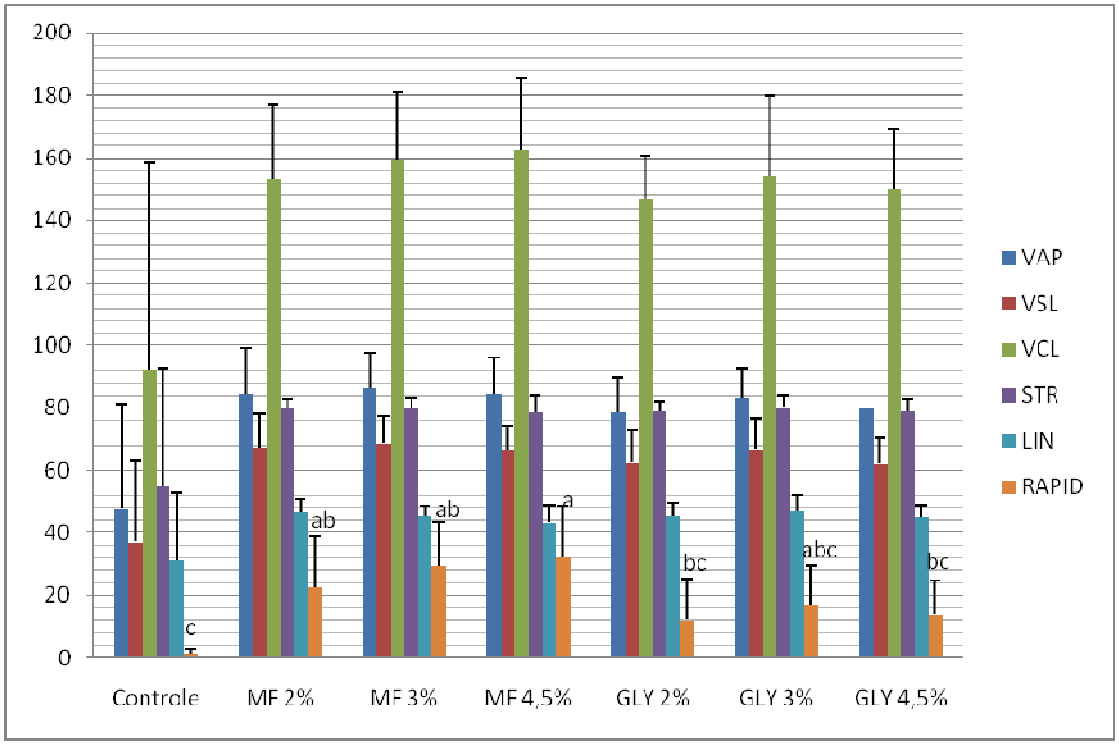
Figura 4 – Médias e desvios padrão do sêmen, referentes aos parâmetros motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10) na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-descongelação.

Tabela 4 – Médias e desvios padrão do sêmen referentes aos parâmetros 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), velocidade espermática real (VCL), linearidade (LIN), índice retilíneo (STR), percentual de espermatozóides rápidos (RAPID), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10), na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-descongelação.

TRATAMENTO	PARÂMETROS (%)					
	VAP	VSL	VCL	STR	LIN	RAPID
CONTROLE	47,6^{b}	37,1^{b}	92,2^{b}	54,7^{b}	3^{b}	1,5^{c}
MF 2%	84,5^{a}	67,4^{a}	153,5^{a}	79,8^{a}	46,7^{a}	22,5^{ab}
MF 3%	86,2^{a}	68,6^{a}	59,4^{a}	79,9^{a}	45,4^{a}	29,4^{ab}
MF4,5%	84,5^{a}	66,4^{a}	162,6^{a}	78,6^{a}	43,3^{a}	32,6^{a}
GL 2%	78,6^{a}	62,4^{a}	146,8^{a}	78,8^{a}	45,4^{a}	12,2^{bc}
GL 3%	83,3^{a}	66,7^{a}	153,9^{a}	80,3^{a}	47,1^{a}	16,6^{abc}
GL4,5%	79,9^{a}	62^{a}	149,8^{a}	78,8 ^{a}	45,1^{a}	3,7^{bc}

MF 2% (metilformamida a 2%), MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2%), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).

Médias seguidas de mesma letra, dentro da mesma coluna, na comparação dos tratamentos para cada variável, não diferem estatisticamente. Valor de $p<0,05$.



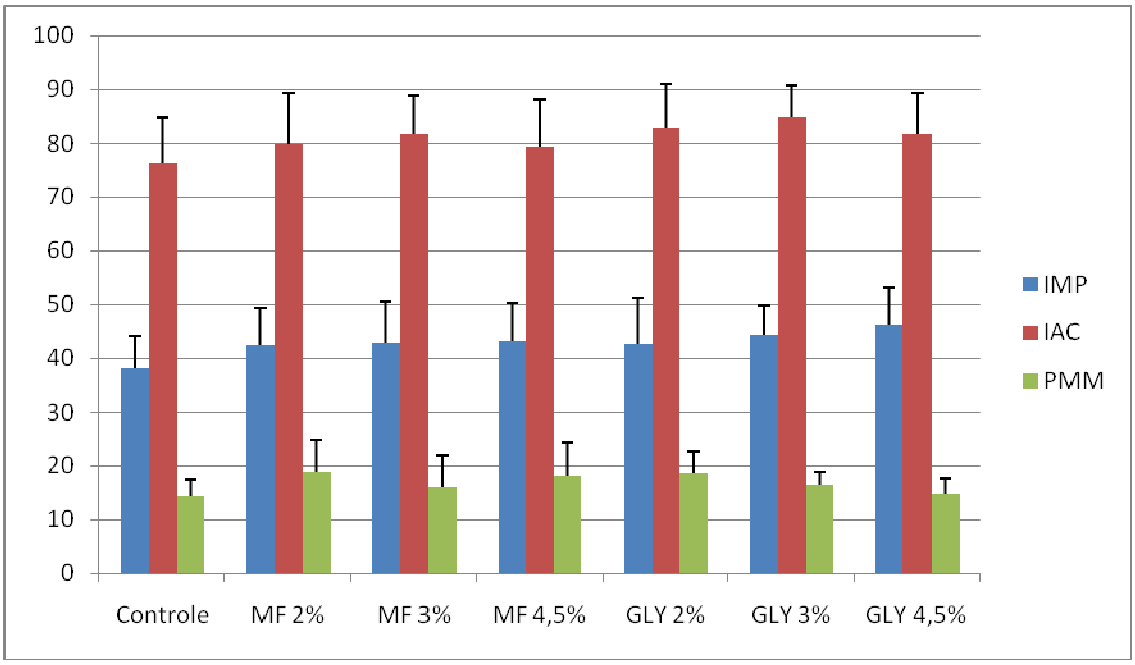
MF 2% (metilformamida a 2%), MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2 %), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).

Figura 5 – Médias e desvios padrão do sêmen referentes aos parâmetros 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), velocidade espermática real (VCL), linearidade (LIN), índice retilíneo (STR), percentual de espermatozóides rápidos (RAPID), avaliados pelo sistema computadorizado (HTMA-IVOS-10), na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós-descongelação.

Tabela 5 – Médias e desvios padrão do sêmen, referentes aos parâmetros integridade de membrana plasmática (IMP), integridade acrossomal (IAC) e potencial mitocondrial (PMM), avaliado pelo microscópio de epifluorescência na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós congelação.

TRATAMENTO	PARÂMETROS (%)		
	IMP	IAC	PMM
CONTROLE	38,1± 6	76,3 ±8,6	14,3 ± 3,1
MF 2%	42,5 ± 6,8	79,8 ±9,5	18,7 ± 5,9
MF 3%	42,8 ± 7,6	81,7 ± 7,1	15,9 ± 6
MF 4,5%	43,1 ± 7,2	79,5 ± 8,6	18 ± 6,2
GL 2%	42,7±8,5	83 ± 8	18,6 ± 3,9
GL 3%	44,3± 5,4	84,8 ± 5,9	16,3 ± 2,5
GL 4,5%	46,2 ±7	81,7 ± 7,7	14,6 ± 3

MF 2% (metilformamida a 2%). MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2%), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).



MF 2% (metilformamida a 2%); MF 3% (metilformamida a 3%), MF 4,5% (metilformamida a 4,5%), GL 2% (glicerol a 2%), GL 3% (glicerol a 3%), GL 4,5% (glicerol a 4,5%).

Figura 6 - Médias e desvios padrão do sêmen, referentes aos parâmetros integridade de membrana plasmática (IMP), integridade acrossomal (IAC) e potencial mitocondrial (PMM), avaliado pelo microscópio de epifluorescência na comparação dos diferentes tratamentos estudados, pós congelação.

5.2. EXPERIMENTO II: Avaliação do efeito contraceptivo dos crioprotetores glicerol e metilformamida

Como demonstrado na Tabela 7 e Figura 7, a fertilidade não foi prejudicada no período pós-estabilização, com a exposição dos espermatozóides aos crioprotetores adicionados, pois não houve diferença significativa (p>0,05) entre os grupos estudados: Contr., MF3% e GL3%. O mesmo ocorreu entre os garanhões utilizados no teste de fertilidade.

Tabela 6 - Percentual de fertilidade por garanhão e total, após o período de estabilização (5℃ / 1 hora) utilizando os grupos Contr., MF 3% (metilformamida 3%) e GL 3% (glicerol 3%).

ANIMAL	CONTROLE	MF 3%	GL 3%
Garanhão1(n=24)	50 (4/8)	50 (4/8)	62,5 (5/8)
Garanhão2(n=24)	62,5 (5/8)	37,5(3/8)	37,5 (3/8)
Total (n=48)	56,25 (9/16)	43,75 (7/16)	50 (8/16)

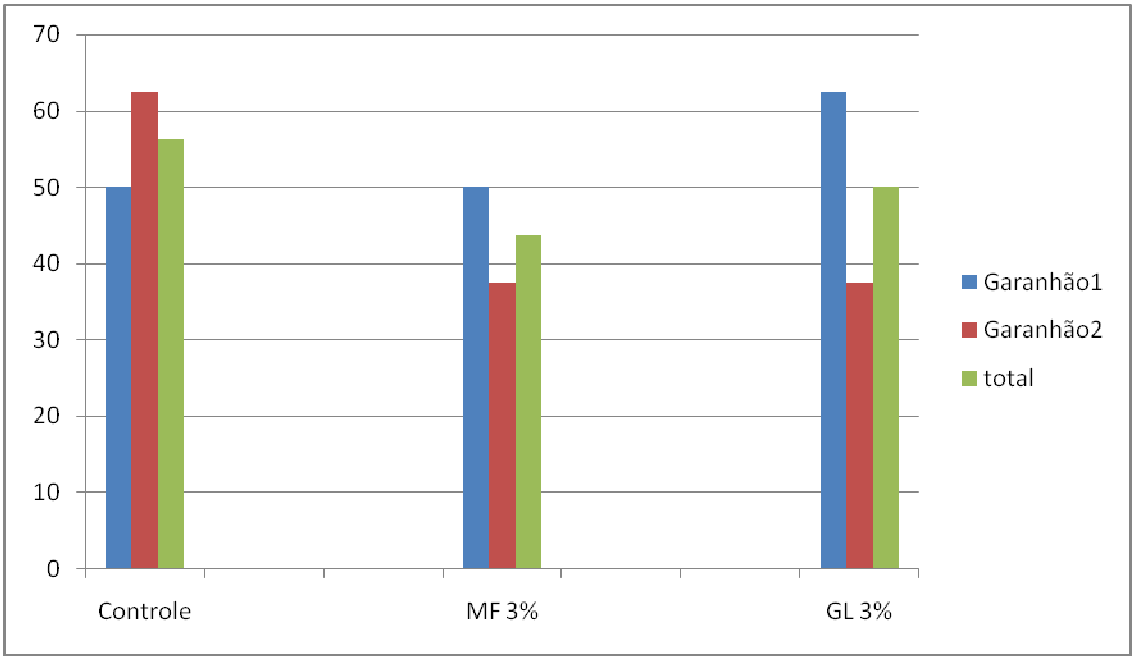


Figura 7 – Percentual de fertilidade por garanhão e total, após o período de estabilização (5℃ / 1 hora) utilizando os grupos Contr., MF 3% (metilformamida 3%) e GL 3% (glicerol 3%).

6. DISCUSSÃO

Os resultados do EXPERIMENTO I, onde foram comparados diferentes concentrações de metilformamida e glicerol, evidenciaram que não houve efeito deletério nas avaliações realizadas pelo sistema computadorizado entre os grupos estudados durante o período de estabilização (5°C/1 hora) do processo de congelação. Por outro lado, os grupos contendo crioprotetores apresentaram-se numericamente superiores ao grupo Contr., para os parâmetros avaliados durante o estudo, sendo o grupo MF2% significativamente superior ao grupo Contr. (25,7 e 13,5%, respectivamente) no parâmetro de motilidade progressiva.

Em relação aos grupos do presente estudo, Crockett *et al.* (2001) estudando o efeito de três diluidores (leite desnatado com açúcar e gema de ovo – SMEY; leite desnatado com gema de ovo e sais – EYCO; leite desnatado – SM) durante o período de estabilização (5°C/ 2,5 horas) obteve resultados superiores de motilidade progressiva (32, 32 e 16%, respectivamente para SMEY, EYCO e SM), quando aos diluente foi adicionado de gema de ovo.

Por outro lado, foi avaliada a integridade acrossomal pré e pós congelação comparando o uso da gema de ovo (20%), o uso de glicerol (4%) e a associação das duas substâncias, concluindo que esta agregação apresentou-se prejudicial em preservar a integridade acrossomal, pois, tanto a associação da gema de ovo com as diversas concentrações estudadas de glicerol, ou somente com a utilização da gema de ovo, não apresentaram resultados satisfatórios para a preservação da integridade acrossomal.

A utilização do crioprotetor metilformamida nas concentrações estudadas (2, 3, e 4,5%) se apresentaram significativamente superiores ao crioprotetor glicerol (2, 3 e 4,5%) para o parâmetro de motilidade total e uma tendência de superioridade (p=0,07) para o parâmetro de motilidade progressiva.

Estes resultados são concordantes com outros trabalhos que comparam esses dois crioprotetores, mesmo em concentrações diferentes ao proposto por este projeto (Gomes *et al*., 2002; Medeiros *et al*., 2002; Alvarenga *et al*., 2005; Landim-Alvarenga *et al*., 2005). No entanto, são discordantes dos resultados

obtidos por Keith (1998), Graham (2000) e Squires *et al.* (2004), quando, mesmo utilizadas concentrações similares de metilformamida e glicerol, não foram observadas diferenças entre os dois crioprotetores. Contudo, quando estes mesmos autores utilizaram uma concentração superior de metilformamida (0,6M e 0,9M), foi constada uma melhoria nos parâmetros de motilidade total e motilidade progressiva em comparação aos demais crioprotetores estudados.

Ainda, de acordo com estes autores, quando comparadas as diferentes concentrações do mesmo crioprotetor (2, 3 e 4,5%), também não foram observadas diferenças significativas entre os parâmetros de motilidade total pós-congelação. Fato este que difere dos resultados apresentados por Keith (1998), para o qual o crioprotetor metilformamida na concentração de 0,3M foi significativamente inferior as concentrações de 0,6M e 0,9M (37,5; 47,9 e 54,2%, respectivamente) no tempo 0 minuto. Porém, 20 minutos após o congelamento estes valores foram similares; com motilidade total de 43,3; 50,6 e 47,1%, respectivamente para 0,3M; 0,6M e 0,9M.

No entanto, os resultados encontrados apresentaram-se similares aos obtidos por Vidament *et al.* (2002) quando, comparadas diferentes concentrações de glicerol, não foram observadas diferenças significativas na motilidade total entre as concentrações de 1, 2 e 3%, deste crioprotetor.

Para os diversos padrões de velocidade espermática avaliados através de análise computadorizada (VAP, VSL, VCL, STR. LIN) os resultados para os grupos estudados contento crioprotetor não diferiram entre si; conforme esperado eles se apresentaram sempre superiores ao grupo Contr. ($P<0,05$). Resultados similares foram obtidos por Medeiros (2003) quando este utilizou os crioprotetores metilformamida e glicerol na concentração de 5% (85,6–78,5; 65,7–60,2; 159,9–147,7 e 42–43, respectivamente para VAP, VSL, VCL e LIN).

Arruda (2000) estudando diferentes diluentes para congelação com a utilização de dois crioprotetores (glicerol e etilenoglicol) e utilizando o diluente INRA82 com a concentração de 5% de glicerol obteve resultados similares nos parâmetros de VAP, VSL, STR e LIN (74,7; 63,4; 83,6 e 55, respectivamente);

superiores para os parâmetros de motilidade progressiva e RAPID (36 e 34,5%, respectivamente) e inferior no parâmetro de velocidade VCL (117,1).

Segundo Vidament *et al.* (2005), quando avaliado o percentual de células rápidas (RAPID), o grupo Contr. se apresentou significativamente inferior ao grupo onde foi utilizado o crioprotetor metilformamida e similar ao grupo com o glicerol. Similares aos resultados obtidos por Medeiros (2003) onde os valores encontrados foram 32,5 e 14 respectivamente para MF5% e GL5%, ou seja, os parâmetros VAP e RAPID apresentam boa correlação com o índice de fertilidade.

Na avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, e potencial de membrana mitocondrial não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados, concordando com os achados de Alvarenga *et al.* (2000), onde a integridade de membrana plasmática foi também similar quando comparados os crioprotetores glicerol, etilenoglicol, DMSO e dimetilformamida (39, 43, 37 e 40%, respectivamente). Surpreendente foi a observação de que o grupo Contr. apresentou percentual de preservação de membrana similar aos demais grupos estudados, não havendo relação com a preservação da motilidade total pós-descongelação no grupo sem crioprotetor, onde a média de motilidade total, pós-descongelação, foi de 3,7% e de integridade da membrana plasmática foi de 38,1% de espermatozóides viáveis. Provavelmente este fato esteja relacionado a ação de outros agentes crioprotetores (não penetrantes – estabilização das membranas celulares) contidos no meio diluente para congelação com leite e gema de ovo e pelo controle adequado da taxa de refrigeração no processo de congelação e descongelação utilizada.

Outro estudo a ser destacado foi o apresentado por Fürst *et al.* (2005), onde, utilizando-se de um resfriamento prévio (estabilização), durante o processo de congelação, foi avaliado o efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade, e o resultado obtido foi que a membrana apresentou um integridade superior ao até então encontrado (71% *versus* 54,1%).

No EXPERIMENTO II, em que foram realizadas inseminações após o período de estabilização a 5°C, a avaliação do efeito contraceptivo através do

teste de fertilidade não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados (56,25; 43,8 e 50%, respectivamente para Contr., MF3% e GL3%). Isto demonstra que, na concentração de 3%, a MF e o GL não têm efeito deletério sobre a fertilidade.

Estes resultados são concordantes com os obtidos por Vidament *et al*. (2008) quando, num estudo similar, realizando inseminações em éguas, após o período de estabilização (4°C/1 hora) utilizou-se o crioprotetor glicerol nas concentrações de 0; 2,2; 3,5 e 4,8% e obteve-se 86,7; 53,3; 53,3 e 13,3%, respectivamente, para resultados de prenhêz. O mesmo autor também efetuou inseminações em jumentas, com o sêmen de jumentos, após o período de estabilização (4°C/1 hora), com a utilização dos crioprotetores glicerol (1,9%), dimetilformamida (2%), etilenoglicol (1,3%) e sem crioprotetor e obteve, como resultado de fertilidade 8; 67; 1,3 e 64%, respectivamente para GL, DMF, EG sem crioprotetor, demonstrando que o glicerol é altamente tóxico para sêmen de jumentos.

Medeiros (2007) observou que após a indução do choque osmótico em solução de glicerol a 1 Molar (aproximadamente 10%) este foi altamente deletério na fertilidade de um garanhão da raça Mangalarga Marchador, no entanto, não se apresentou deletério para a fertilidade de garanhões da raça Westfallen, portanto, neste mesmo experimento a MF, também utilizada a 1 Molar, não depreciou a fertilidade.

Por outro lado, no estudo para esta dissertação, não houve diferença entre os animais das duas raças, demonstrando que a concentração de 3%, independente do crioprotetor utilizado, é bastante segura.

Foi visto que a concentração de glicerol varia de acordo com o meio diluente ao qual será adicionado; o diluente INRA82 se mostra ideal com concentração de 2-3% (Ecot *et al*., 2000; Vidament *et al*., 2002). Para o diluente Lactose-Glucose EDTA a concentração comumente utilizada é a de 4% (Cochran *et al*., 1984; Cristanelli *et al*., 1985). No diluente Kenney adaptado para congelação, com a adição de 2,5% de gema de ovo, a concentração que melhor preservou a motilidade pós-descongelação foi a de 2% de glicerol. (Burns & Reasner, 1995)

Estes estudos estão em sintonia com o presente trabalho, onde verificou-se, através de características laboratoriais, que a concentração de 2% de glicerol foi adequada para a congelação de sêmen eqüino.

Por outro lado, Pace e Sullivan (1975) apresentam que a adição do crioprotetor glicerol tem se mostrado prejudicial quando utilizada em altas concentrações em sêmen fresco ou refrigerado. Foi observada uma queda na fertilidade com a adição de 7% de glicerol (70% *versus* 35%), utilizando sêmen *in natura*. Já, em Demick *et al.* (1976), foram realizadas inseminações utilizando-se sêmen refrigerado sem e com a adição de glicerol (7%), obtendo uma taxa de fertilidade, na ordem de 83% no grupo sem adição de glicerol *versus* 44% com glicerol.

Além da espécie eqüina, esse efeito prejudicial tem sido relatado em outras espécies, tais como: humanos (Panayota *et al*., 1998; Crister *et al*., 1998); cães (Hay *et al*., 1997); galos (Phillips *et al*., 1996); suínos (Murdoch & Jones, 1978; Fiser & Fair Full, 1990) e carneiros (Watson & Martin, 1975). No entanto, tem-se em Vidament *et al.* (2008), que a remoção do glicerol de espermatozóides congelados de galo, por diluição ou centrifugação, como uma parte do processo de descongelação, restaurou sua capacidade fertilizante.

A manutenção da motilidade do sêmen após a congelação utilizando derivados de amidas deve estar relacionada à melhor capacidade de proteção ao espermatozóide durante a congelação. Isto foi observado neste experimento, assim como em outros trabalhos publicados recentemente. (Alvarenga 2002; Medeiros, 2003, 2007)

A fertilidade do sêmen de garanhões congelados com crioprotetores à base de amidas tem sido estudada mais recentemente. Medeiros (2003) inseminou 15 éguas com diluente contendo 5% de dimetilformamida e, outras 15 éguas, com diluente contendo 5% de glicerol; obteve índice de fertilidade de 40% com o uso da dimetilformamida e nenhuma prenhes com a utilização do glicerol. O mesmo foi observado em Moffet *et al*. (2003) onde foi obtido uma taxa de prenhêz de 40% com a dimetilformamida e de 14% com o glicerol, ambos a uma concentração de 5%, quando utilizado o sêmen de 1 garanhão da raça Mangalarga Marchador.

Com base nos resultados de Vidament *et al*. (2005), que demonstraram ser o glicerol a 5% contraceptivo, podemos supor que a baixa fertilidade observada nos dois experimentos citados anteriores possa ser decorrente de efeito tóxico ocorrido antes da congelação; reforçando, assim, a idéia de que o glicerol pode ser utilizado em concentrações próximas de 3%.

7. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho, nas condições em que foi realizado, permitem concluir que:

1 – O glicerol e a metilformamida, quando utilizados nas concentrações usuais para criopreservação, não causam nenhum efeito deletério durante o processo de refrigeração (estabilização), prévio à congelação.

2 – Os crioprotetores glicerol e metilformamida foram eficientes em proteger as células espermáticas dos danos da congelação nas três concentrações estudadas (2, 3 e 4,5%); sendo, contudo, a metilformamida superior ao glicerol.

3 – A exposição aos dois crioprotetores estudados durante o período de estabilização, na concentração de 3%, não prejudica a fertilidade do sêmen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, V.A.; Hinsch, K.D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparasion of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. **Theriogenology**, v. 60, p.269-279, 2003.

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

ALVARENGA, M.A. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. Workshop on transporting gametes and embryos. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, p. 74-76, 2003.

ALVARENGA, M.A.; GRAHAM, J.K.; KEITH, S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, S.L. Alternative cryoprotector for freezing stallion spermatozoa. 14th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. **Proceedings**, Stockholm, p. 157, 2000.

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

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 07, p. 145-173, 1987.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozóides eqüino 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 São Paulo. Botucatu, 2000.

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

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

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

BURNS, P.J.; REASNER, D.S. Computerized analisys of sperm motion: effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equines spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 15, p. 377-380, 1995.

CELEGHINI, C.C.C.; ARRUDA, R.P.; SILVA, F.H.A; FARIA, D.E.; ANDRADE. A.F.C.; J. RAPHAEL, C.F. Utilization of fluorescent probe association for simultaneous assessment of plasmatic, acrossomal and mitochonarial membrane of rooster spermatozoa. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 9(3), 2007.

CHENIER, T.; MERKIES, K.; LEIBO, S.; PLANT, C. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. **Proceedings For Annual Meeting**. Maryland, p. 52-53, 1998.

COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P.; PICKETT, B.W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5º C freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology**, p. 22-25, 1984.

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.

CRISTER, J.K.; MOBRAATEN, L.E. Criopreservation of murine spermatozoa. **Ilar Journal**, v. 41, p. 197-206, 2000.

CRITSER, J.K.; HUSE-BENDA, A.R.; AAKER, D.V.; AMESON, B.W.; BALL, G.D. Criopresevation of human spermatozoa. III. The effect of crioprotectants on motility. **Fertil. Steril**, v. 50, p. 314-320, 1998.

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

CURRY, M.R. Cryopreservation of semen from domestic livestock. **Rev. Reprod**, v. 5, p. 46-52, 2000.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and metyl cellulose. **Theriogenology**, v. 49, p. 831-841, 1997.

DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, 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. 30, p. 32-44, 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.

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

ECOT, P.; VIDAMENT, M.; MONARC, A. Freezing of stallion semen: Interactions among cooling treatments, semen extender and stallions. **J. Reprod. Fertil**, v. 56, p. 141-150, 2000.

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

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0,5 ml straws. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 25, p. 123-129, 1990.

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.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES , A.M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, p. 599-607, 2005.

GAO, D.; CRISTER, J.K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **Ilar Journal**, v. 41(4), p. 187-196, 2000.

GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SODERQUIST, L.; MARTINEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell® and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v. 59, p.1157-1170, 2003.

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

GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectans for preserving stallion spermatozoa. 14th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. **Proceedings,** Stockholm, p. 307, 2000.

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

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

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

KAROW, A.W. **Cryobiology 2001 for mammalian embryologists.** Disponível no site [www. Xytex.com.br]. Acesso em 20/03/2006.

KEITH, S. **Evaluation of new cryoprotectans for the preservation of equine spermatozoa.** Tese douturado; Colorado State Unirversity Fort Collins,1998.

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

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A.; GRAHAM, J.K.; SQUIRE, E.L. Viability and ultra structure of stallion spermatozoa cryopreserved with glycerol and DMSO. 3rd International Symposium on Stallion Reproduction Colorado State University. **Proceeding Fort Collins**, p. 61, 2001.

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

LOVELOCK, J.E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochemic Journal**, v. 58, p. 618-622, 1954.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal Physiology**, v. 247, p.125-142, 1980.

McLAUGHIN, E.A.; FORD, W.C.L.; HULL, M.G.R. The contribution of the toxicity of a glycerolegg- yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 749–754, 1992.

MEDEIROS, A.S.L. **Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade de sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores**. 2007. 94p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2007

MEDEIROS, A.S.L. **Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozóides de garanhões**. 2003. 96p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp. Botucatu, 2003.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.C.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation on stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, p. 273-276, 2002.

MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FAGUNDES, A.C. Congelação de semen eqüino em etilenoglicol ou glicerol: motilidade, vigor e teste de termo resistência – estudos preliminares. XI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. **Proceedings**. Belo Horizonte, p. 290, 1995.

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

MURDOCH, R.N.; JONES,R.C. The effects of glycerol on the metabolism and ultrastructure of boar spermatozoa. **J. Reprod. Fert**, v. 54, p. 419-422, 1978.

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

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

NEVES NETO, J.R.; MERCANTE, C.FJ.; ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A. Fertilidade do sêmen congelado eqüino etileglicol e glicerol. XI Congresso Bras. Reprodução Animal, 1995. **Proceedings**, Belo Horizonte, p. 292, 1995.

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.

PANAYOTA, N.Z.Z; ASLANIS, P.; ZAVOS, P.M.; CORREA, J.R.; ANTIPAS, S. Occurence of osmotis shock in human spermatozoa its effects on the qualitative measurements of frozen-thawed spermatozoa. **Middle East Fertility Society Journal**, v. 3, p. 66-72, 1998.

PAPA, F. O., MEIRA. C., SIMON, J. J. FERREIRA, J. C. P., DELL'ÀQUA Jr. J. A., LEME, D. P. Pregnancies in mares using donkey (equus asinus) frozen semen. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, 1999. v. 27, p.262.

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

PHILLIPS, J.J.; BRAMWELL, R.K.; GRAHAM, J.K. Criopreservation of rooster sperm using methyl cellulose. **Poult. Sci.**, v. 75, p. 915-923, 1996.

ROASA L.M.; CHOI Y.H.; LOVE C.C.; ROMO S.; VARNER D.D.; HINRICHS K. Ejaculate and type of freezing extender affect rates of fertilization of horse oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 68(4), p. 560-566, 2007.

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.

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

SMITH, A.U.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperature. **Nature**, v. 166, p. 668-669, 1950.

SQUIRES, E.; KEITH, S.;GRAHAM, J. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion. **Theriogenology**, v. 62(6), p. 1056-1065, 2004.

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

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J. M.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethylformamide. **Theriogenology**, v. 58, p. 249-251, 2002.

VIDAMENT, M.; VICENT P.; MARTIN, FX.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, 2008.

VISKANTA, R.; BIANCHI, M.V.A.; CRITSER, J.K.; GAO, D. Solidification processes of solutions. **Cryobiology**, v. 34, p. 348-362, 1997.

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

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

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

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

WOLFE, J.; BRYANT, G. Celular Cryobiology: Thermodinamic and Mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 436-450, 2001.