

ANTONIO SYLVIO LOPES DE MEDEIROS

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE
AMIDAS COMO AGENTES CRIOPROTETORES
PARA ESPERMATOZÓIDES DE GARANHÕES**

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

Orientador: ***Prof. Ass. Dr. Marco Antonio Alvarenga***

Botucatu – SP

2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Medeiros, Antonio Sylvio Lopes de.

Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores na
congelamento de espermatozoides de garanhões / Antonio Sylvio Lopes de
Medeiros. – 2003.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Assunto CAPES: 50504002

1. Equino - Reprodução 2. Sêmen - Criopreservação

CDD 636.108926

Palavras-chave: Espermatozoides; Criopreservação; Agentes crioprotetores

DEDICO...

A Deus.

Senhor, meu coração não se enche de orgulho, meu olhar não se levanta
arrogante.

Não procuro grandezas, nem coisas superiores a mim, ao contrario
mantenho em calma e sossego minha alma.
Assim está a minha alma em mim mesmo.

Salmo 130.

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

Salmo 61- 12, 13.

A minha Família.

A minha esposa Aparecida e minhas filhas, as quais sempre me apoiaram
em minhas conquistas e derrotas e hoje são a razão de meu existir.

Aos meus pais.

Ludovico Lopes de Medeiros Neto e Maria Isabel Ornelas Lopes de
Medeiros.

Pessoas de fibra, que diversas vezes renunciaram seus interesses próprios
em razão dos meus.

Os quais eu devo minha educação e meu caráter, moldados em valores
concretos da vida.

Aos meus sogros.

Sr. Benedito Rodrigues e Sra. Cyrene Gomes Rodrigues *In memoriam*.
Os quais me adotaram como filho tornando-se meus segundos pais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo Prof. Ass. Dr. Marco Antonio Alvarenga, profissional de competência singular e excelente pesquisador e, acima de tudo, uma grande pessoa, pelas oportunidades oferecidas e confiança depositada em mim durante a execução deste trabalho.

Ao meu amigo José Antonio Dell'Aqua Jr., companheiro de velha data, pelo seu incentivo e ajuda durante a minha vida profissional.

Ao meu amigo Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa, grande mestre, pelo entusiasmo contagiante que me transmitia em relação a pesquisas voltadas em nossa área em comum.

Aos meus amigos de pós graduação Marcio, Bigu, Karen, pelo enorme auxílio durante a execução deste trabalho.

Ao Professor Dr. Cezinande de Meira e família, atuais amigos, o qual mostrou enorme bondade dando condições para minha permanência em Botucatu durante o curso de mestrado.

A Professora Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, pela elaboração das análises de Microscopia eletrônica e sugestões na elaboração deste trabalho.

Aos Professores Sony Dimas Bicudo, Maria Denise Lopes, João Carlos Pinheiro Ferreira, Nereu Carlos Prestes, pelas aulas ministradas e dúvidas solucionadas durante o curso de mestrado.

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

Ao Haras Agromen, na pessoa do proprietário Sr. José Mendonza, dos Veterinários Cássio Trinquê e Marcelo Mantra e funcionários, os quais abriram as portas do haras me permitindo a colheita de materiais para a realização de meu trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado (Processo 00/14135-5).

ÍNDICE

Lista de Tabelas.....	a
Lista de Gráficos.....	d
Lista de Anexos.....	f
Sumário.....	h
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	5
2.1. Comportamento das células espermáticas em baixas temperaturas.....	5
2.2. Agentes crioprotetores adicionados ao meio diluente de congelamento.....	7
2.2.1. Agentes crioprotetores não penetrantes.....	8
2.2.1.1. Açúcares.....	8
2.2.1.2. Gema de ovo.....	9
2.2.1.3. Proteínas do leite.....	10
2.2.1.4. Aminoácidos.....	11
2.2.2. Agentes crioprotetores penetrantes.....	12
2.2.2.1. Glicerol.....	13
2.2.2.2. Etilenoglicol.....	15
2.2.2.3. DMSO (Dimetilsulfóxido).....	16
2.2.2.4. Amidas.....	17
2.3. Métodos de avaliação do sêmen pós-descongelamento.....	19
2.3.1. Avaliação da motilidade espermática.....	19
2.3.2. Avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides.....	20
2.3.3. Avaliação da integridade acrossomal.....	21
3. Materiais e Métodos.....	23
3.1. Experimentos.....	23

ÍNDICE

3.1.1. Experimento I.....	23
3.1.2. Experimento II.....	23
3.2. Animais.....	24
3.3. Análise e processamento do sêmen a fresco.....	24
3.4. Crioprotetores e meio diluente utilizado na congelação das amostras dos experimentos I e II.....	25
3.5. Acondicionamento, estabilização e congelação das amostras dos experimentos I e II.....	26
3.6. Descongelação das amostras.....	26
3.6.1. Experimento I.....	26
3.6.1.1. Análise da motilidade espermática por microscopia óptica.....	26
3.6.1.2. Análise computadorizada do movimento espermático.....	26
3.6.1.3. Análise da integridade da membrana espermática através de sondas fluorescentes.....	27
3.6.1.4. Análise ultraestrutural da integridade acrossomal através de microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	27
3.6.1.5. Avaliação da integridade acrossomal através de sondas fluorescentes.....	28
3.6.1.6. Teste de fertilidade.....	29
3.6.2. Experimento II.....	31
3.6.2.1. Análise da motilidade espermática por microscopia óptica.....	31
3.6.2.2. Análise computadorizada do movimento espermático.....	31
3.6.2.3. Análise da integridade da membrana espermática através de sondas fluorescentes.....	31
4. Análise estatística.....	33
5. Resultados.....	34

ÍNDICE

5.1. Resultados do experimento I.....	34
5.2. Resultados do experimento II.....	50
6. Discussão.....	55
7. Conclusões.....	63
8. Referências bibliográfica.....	64
9. Abstract.....	78

SUMÁRIO

O presente estudo foi dividido em dois experimentos. O Experimento I objetivou avaliar crioprotetores alternativos, como as amidas, em relação ao glicerol. Utilizaram-se 20 ejaculados (10 garanhões), o sêmen foi congelado com o diluente de congelamento INRA 82, acrescido dos crioprotetores, caracterizando os tratamentos DA1, DA3 e DA5 (dimetilacetamida a 1, 3 e 5% respectivamente), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%) e GL5 (glicerol a 5%).

Nos resultados de motilidade total avaliado por microscopia óptica e computadorizada os tratamentos amidas foram superiores ao glicerol ($p < 0,0001$). Em relação a motilidade progressiva (óptica) os tratamentos MF5 e DF5 mostraram-se superiores aos demais tratamentos ($p < 0,0001$), no parâmetro de motilidade progressiva computadorizada os tratamentos MF5 e DA3 foram mais eficientes comparados aos demais tratamentos ($p < 0,0001$). Na avaliação de integridade espermática os tratamentos amidas foram superiores ao tratamento GL5 ($p < 0,0001$).

No parâmetro de linearidade (LIN), o tratamento DA1 apresentou um percentual maior aos demais tratamentos ($p < 0,0001$). Na percentagem de espermatozoides rápidos (RAP) os tratamentos DF5 e MF5, foram superiores aos tratamentos DA1, DA3, DA5 e GL5 ($p < 0,0001$).

Nos padrões de velocidade espermática: VAP (velocidade do trajeto espermático) os tratamentos DF5 e MF5 foram estatisticamente superiores aos tratamentos DA3, DA1, GL5 e DA5, na VSL (velocidade retilínea) os tratamentos MF5 e DF5 foram superiores aos tratamentos DA1, DA3, GL5 e DA5 e na VCL (velocidade real) o tratamento DF5 foi superior aos tratamentos MF5, DA1, DA3, DA5 e GL5 ($p < 0,0001$).

Na análise de acrossoma por microscopia eletrônica de transmissão os tratamentos DA5 e MF5, foram mais eficazes em manter a integridade acrossomal pós-descongelamento em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$), na avaliação por fluorescência (FITC – PNA e Iodeto de Propídio), os tratamentos DA5, MF5 e DF5 foram superiores aos tratamentos DA1, DA3 e GL5 ($p < 0,05$).

A correlação entre as técnicas da integridade acrossomal avaliadas por fluorescência (FITC – PNA e Iodeto de Propídio) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), considerando-se alguns danos leves da membrana

acrossomal como Acrossoma integro foi positiva e significativa ($r=0,85$ e $p=0,03$). Na avaliação do potencial fecundante pós-descongelamento do sêmen congelado com os crioprotetores diferentes crioprotetores (teste de fertilidade), as inseminações realizadas com sêmen congelado com o tratamento DF5, resultaram em uma taxa de prenhez de 40% (6 prenhez em 15 inseminações), superando o tratamento GL5 onde as 15 inseminações não resultaram em prenhez ($p<0,017$).

O experimento II objetivou-se estudar as associações da dimetilformamida (DF) com o glicerol (GL), T. I (1,5% DF + 3,5% GL) e T. II (3,5% DF + 1,5% GL) comparado com os crioprotetores isolados DF 5% (T. III) e GL 5% (T. IV).

No parâmetro de motilidade total óptica (MTO) o tratamento III apresentou motilidade total superior aos demais tratamentos ($p<0,0001$). Na motilidade progressiva óptica (MPO) os tratamentos II e III apresentaram valores superiores aos tratamentos I e IV ($p<0,016$). Os resultados de Motilidade Total Computadorizada (MTH), os tratamentos: I, II, III e IV apresentaram a mesma tendência estatística nos parâmetros de Motilidade Total Óptica. Na avaliação de integridade de espermática o tratamento III apresentou-se superior aos demais tratamentos ($p<0,0001$).

Na variável vigor os tratamentos I, II e III mostraram-se superiores ao tratamento IV ($p<0,0001$). Na variável linearidade (LIN) os tratamentos I e IV foram superiores ($p<0,0001$) aos tratamentos II e III e na percentagem de espermatozoides rápidos (RAP) os tratamentos II e III apresentaram-se superiores ($p<0,0001$) aos tratamentos I e IV. Nos valores de VCL os tratamentos II e III apresentaram-se superiores ($p<0,0002$) aos tratamentos I e IV.

Os resultados do presente trabalho demonstraram uma superioridade dos derivados de amidas em proteger as células espermáticas de danos frente aos danos relacionados a congelamento e descongelamento nos diferentes parâmetros avaliados e bem como no potencial fertilizante dos espermatozoides pós-descongelamento.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Média e desvio padrão () referente as variáveis, Motilidade óptica total (MTO), Motilidade óptica progressiva (MPO), Motilidade computadorizada total (MTH), Motilidade computadorizada progressiva (MPH) e % de íntegros analisados por fluorescência (INT.) na comparação dos tratamentos DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5% (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%).....	37
---	----

TABELA 2 - Mediana e 1 ^o e 3 ^o quartil [] referente as variáveis VIGOR (escala de 0 a 5), % de Linearidade (LIN), % de Rápidos (RAP), segundo os tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%) e GL5 (glicerol a 5%).....	39
--	----

TABELA 3 - Média e desvio padrão () referentes as variáveis, VAP, VSL e VCL, na comparação dos tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%).....	41
---	----

TABELA 4 - Comparações das percentagens, referente à integridade acrossomal e acrossomos lesados através de análise ultraestrutural (Microscopia Eletrônica de Transmissão), segundo os tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%).....	44
---	----

TABELA 5 - Percentagem das alterações acrossomais avaliadas por fluorescência (FITC PNA e Iodeto de Propídio), segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.....	46
TABELA 6 - Integridade acrossomal das amostras, segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5, avaliados através de sondas fluorescentes (FITC – PNA e Iodeto de propídio).....	46
TABELA 7 - Integridade acrossomal das amostras através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) incluindo como normais as ondulações da membrana acrossomal, segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.....	47
TABELA 8 - Correlação dos resultados de integridade acrossomal entre as técnicas de avaliação; Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e fluorescência (FITC – PNA e Iodeto de Propídio).....	48
TABELA 9 - Distribuição de frequências absolutas e relativas do teste de fertilidade segundo o tipo do crioprotetor utilizado no sêmen congelado.....	49
TABELA 10 - Média e desvio padrão () referentes as variáveis, Motilidade total óptica (MTO), Motilidade progressiva óptica (MPO), Motilidade computadorizada total (MTH), Motilidade progressiva computadorizada (MPH), % de íntegros analisados por fluorescência (INT.), segundo os tratamentos: I (1,5% de DF +3,5% de GL), II (3,5% de DF + 1,5% de GL), III (5% de DF), IV (5% de GL).....	51
TABELA 11 - Mediana, 1 ^o e 3 ^o Quartil [] referente as variáveis, Vigor (escala de 0 a 5), Linearidade (%) e % de Rápidos, segundo os tratamentos: I (1,5% de DF+ 3,5% de GL), I (3,5% de DF+ 1,5% de GL), III (5% de DF) e IV (5% de GL).....	53

TABELA 12 - Média e desvio padrão () referente as variáveis, VAP, VSL, VCL, na comparação dos tratamentos; I (1,5% de DF+ 3,5% de GL), II (3,5% de DF+ 1,5% de GL), III (5% de DF), IV (5% de GL).....	54
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** - Médias referentes as variáveis, Motilidade óptica total (MTO), Motilidade óptica progressiva (MPO), Motilidade computadorizada total (MTH), Motilidade computadorizada progressiva (MPH) e % de íntegros analisados por fluorescência (INT.) na comparação dos tratamentos DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5(metilformamida a 5%), DF5% (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%)..... 38
- GRÁFICO 2** - Medianas referentes as variáveis VIGOR (escala de 0 a 5), % de Linearidade (LIN), % de Rápidos (RAP), segundo os tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%) e GL5 (glicerol a 5%)..... 40
- GRÁFICO 3** - Médias referentes as variáveis, VAP, VSL e VCL, na comparação dos tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%)..... 42
- GRÁFICO 4** - Comparações das percentagens, referente à integridade acrossomal e acrossoma lesados através de análise ultraestrutural (Microscopia Eletrônica de Transmissão), segundo os tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%). DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%)..... 45
- GRÁFICO 5** - Integridade acrossomal das amostras, segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5, avaliados através de sondas fluorescentes (FITC – PNA e Iodeto de propídio)..... 47

GRÁFICO 6 - Integridade acrossomal das amostras através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) incluindo as ondulações da membrana acrossomal (MAE e MORA), segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.....	48
GRÁFICO 7 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas do teste de fertilidade segundo o tipo do crioprotetor utilizado no sêmen congelado; PR+(prenhez positiva), PR-(prenhez negativa).....	49
GRÁFICO 8 - Médias referentes as variáveis, Motilidade total óptica (MTO), Motilidade progressiva óptica (MPO), Motilidade computadorizada total (MTH), Motilidade progressiva computadorizada (MPH), % de íntegros analisados por fluorescência (INT.), segundo os tratamentos: I (1,5% de DF +3,5% de GL), II (3,5% de DF + 1,5% de GL), III (5% de DF), IV (5% de GL).....	52
GRÁFICO 9 - Medianas referentes as variáveis, Vigor (escala de 0 a 5), Linearidade (%) e % de Rápidos, segundo os tratamentos: I (1,5% de DF+ 3,5% de GL), II (3,5% de DF+ 1,5% de GL), III (5% de DF) e IV (5% de GL).....	53
GRÁFICO 10 - Médias referentes as variáveis, VAP, VSL, VCL, na comparação dos tratamentos; I (1,5% de DF+ 3,5% de GL), II (3,5% de DF+ 1,5% de GL), III (5% de DF), IV (5% de GL).....	54

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Formulação do meio diluente de Kenney (Kenney et al.,1975).....	79
ANEXO 2 - Formulação do meio diluente INRA 82 (Palmer, 1984).....	80
ANEXO 3 - Valores de osmolaridade e pH dos meios diluentes utilizados na congelação das amostras de sêmen no experimento I e experimento II.....	81
ANEXO 4 - Ajuste do HTM – IVOS – 10 para as realizações das análises seminais em eqüinos (Ferreira, 2000).....	82
ANEXO 5 - Soluções de estoque para a utilização na técnica de fluorescência para avaliação de integridade de membrana.....	83
ANEXO 6 - Solução de Trabalho para coloração fluorescente.....	84
ANEXO 7 - Valores de motilidade total e progressiva avaliados por microscopia óptica, dos diferentes gananhões utilizados no experimento I segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, FD5, GL5.....	85
ANEXO 8 - Valores de motilidade total e progressiva computadorizada, dos diferentes gananhões utilizados no experimento I segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5, GL5.....	86
ANEXO 9 - Valores de vigor avaliado por microscopia óptica e linearidade (%) avaliado pelo HTM, dos diferentes gananhões utilizados no experimento I, segundo os tratamentos DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.....	87
ANEXO 10 - Valores de viabilidade celular avaliado por fluorescência (PI e FDA), dos diferentes gananhões utilizados no experimento I, segundo os	

tratamentos DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.....	88
ANEXO 11 - Valores de VAP e VSL avaliados pelo HTM, dos diferentes ganhões utilizados no experimento I, segundo os tratamentos DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.....	89
ANEXO 12 - Valores de VCL e percentagem de rápidos avaliados pelo HTM, dos diferentes ganhões utilizados no experimento I, segundo os tratamentos DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.....	90
ANEXO 13 - Valores de motilidade óptica (total e progressiva), dos diferentes ganhões utilizados no experimento II, segundo os tratamentos; I, II, III, IV.....	91
ANEXO 14 - Valores de motilidade computadorizada (total e prog.) dos diferentes ganhões utilizados no experimento II, segundo os tratamentos I, II, III, IV.....	92
ANEXO 15 - Valores referentes à integridade celular avaliado por fluorescência (PI e FDA), dos diferentes ganhões utilizados no experimento II, segundo os tratamentos; I, II, III, IV.....	93
ANEXO 16 - Valores de VAP e VSL, dos diferentes ganhões utilizados no experimento II, segundo os tratamentos I, II, III, IV.....	94
ANEXO 17 - Valores de VCL e LIN, dos diferentes ganhões utilizados no experimento I, segundo os tratamentos I, II, III, IV.....	95
Anexo 18 - Percentagem de espermatozoides rápidos (HTM) e valores de Vigor (Microscopia óptica), dos diferentes ganhões utilizados no experimento II, segundo os tratamentos I, II, III, IV.....	96

1. INTRODUÇÃO

A maioria dos povos do mundo, mantêm uma relação apaixonada com o cavalo. O cavalo só não habita regiões de clima e vegetação extremamente inóspitos, onde lhe seria impossível viver ou ser utilizado, nas demais áreas acompanha o homem em sua luta pela sobrevivência. Nenhum outro animal doméstico tem ajudado tanto o homem em quase todas as atividades, ao longo de eras.

A eqüinocultura tem evoluído ao longo dos tempos, passando de uma criação inteiramente voltada a exploração do trabalho a uma atividade multidisciplinar, envolvendo diversas tecnologias de manejo, nutrição e reprodução, no intuito de atingir o máximo potencial genético e fenotípico.

No Brasil, apesar das instabilidades econômicas da atualidade, a eqüinocultura destaca-se, seja pelo seu patrimônio genético e/ou pela performance em esportes hípicas no cenário internacional.

Pesquisas voltadas à reprodução assistida como, a inseminação artificial, a criopreservação de gametas e embriões, transferência de embriões, fertilização *in vitro*, transferência de gametas intra-falopiana (G.I.F.T.) e inseminação intracitoplasmática (I.C.I.S.), no intuito de otimizar o criatório nacional, tem despertado grande interesse entre criadores, associações e comunidade científica.

A congelação de sêmen, umas das biotecnologias mais antigas relacionada à reprodução, teve sua descoberta de uma maneira acidental, onde Polge e seus colaboradores (1949), constataram que ao adicionar glicerol em meios diluentes para congelação de espermatozóides, estes preservaram sua motilidade após a descongelação.

Esta biotecnologia tem contribuído no incremento do potencial genético de animais de interesse zootécnico, na preservação de material genético de espécies ameaçadas de extinção e bem como a vencer barreiras da infertilidade humana.

Na pecuária bovina a inseminação artificial com sêmen congelado, atingiu níveis de eficiência reprodutiva comparáveis à monta natural, auxiliando no incremento genético de algumas raças e beneficiando os seus índices econômicos.

Em eqüinos o primeiro relato científico de sucesso da congelação de espermatozóides eqüinos se deu no ano de 1950, quando Smith e Polge notaram que se espermatozóides eqüino fossem separados do plasma seminal e ressuspensos em soluções tamponadas contendo glicerol e glicose, 25% dos espermatozóides permaneciam viáveis após o congelamento (-79°C), posteriormente Barker e Gandier

(1957), relataram a primeira prenhez de uma égua, decorrente da inseminação com espermatozóides colhidos do epidídimo de garanhões diluídos em meio de congelação a base de leite contendo 10% de glicerol e posteriormente congelados, estes pesquisadores inseminaram sete éguas no qual uma tornou-se prenhe.

Atualmente, o interesse pela utilização da inseminação artificial com sêmen congelado na espécie eqüina é crescente e cerca de 80% das associações americanas de criadores de cavalo permitem seu uso, sendo este grande interesse relacionado às diversas vantagens que esta biotecnologia oferece, como a eliminação dos custos no transporte da égua para cobertura, diminuição dos riscos de acidente no transporte e exposição ao estresse e doenças tanto da égua como do potro lactente, facilidades na aquisição e transporte do sêmen de animais geneticamente superiores através de países ou continentes e possibilidade da utilização de sêmen de garanhões mesmo que estes estejam participando de eventos hípicas, doentes ou mesmo mortos e principalmente o seguro biológico de garanhões geneticamente superiores. Apesar das vantagens, 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 a congelação nesta espécie (Squires, 1999).

Em levantamento realizado na Unesp-Botucatu, onde se estudou o sucesso e insucesso na congelação de sêmen eqüino, aproximadamente 80 garanhões de raças diferentes foram estudados, e concluiu-se que 50% dos garanhões de raças de hipismo (Hannoveriano, Holsteiner e Trackner) e Quarto de milha apresentavam sêmen com um bom padrão de motilidade pós-descongelamento. Contudo, outras raças como Mangalarga e Mangalarga Marchador este percentual cai para 15%, demonstrando assim haver um fator racial e muitas vezes individual relacionado com a resistência espermática ao processo de congelação. Contudo as causas determinantes destas variabilidades são até agora desconhecidas (Alvarenga et al., 1996).

Vidament et al. (1997) ao avaliarem ejaculados de 161 garanhões observaram que destes 19, 30, 27 e 24% obtiveram índices de congelabilidade (motilidade após o descongelamento) de 0%, 0 a 33%, 33 a 66% e acima de 66% respectivamente. Além disso, os autores encontraram uma alta correlação entre fertilidade do sêmen a fresco e congelabilidade ($P < 0,001$) e uma correlação média entre fertilidade do sêmen congelado e índice de congelabilidade ($P < 0,05$). Os resultados de fertilidade/ciclo neste experimento foram, para as éguas com duas ou mais inseminações até o momento da ovulação, de 34% (536/1576) e, com uma única inseminação, de 26%

(163/626). Blottner et al. (2001), constataram que o fator que contribui para o sucesso da congelação de sêmen de eqüinos, talvez esteja relacionado ao indivíduo.

Loomis (2001), concluiu que os fatores que contribuem para o sucesso da utilização comercial do sêmen congelado são: seleção das éguas e garanhões a serem utilizados no programa de inseminação, um bom manejo das éguas a serem inseminadas e principalmente qualidade do sêmen congelado utilizado no programa de inseminação.

Porém, durante o processo de congelação os espermatozóides são expostos a várias situações adversas a sua homeostase, podendo estas promover diversas injúrias a célula espermática.

A presença de algumas substâncias no meio diluïdor de congelação confere alguma proteção aos espermatozóides no processo de criopreservação, mas também algumas, apresentam uma certa toxidez. Estas substâncias são denominadas de crioprotetores, sendo estes subdivididos em crioprotetores penetrantes, os quais desempenham seu mecanismo de ação no meio extracelular e intracelular, e os crioprotetores não penetrantes que atuam somente no meio intracelular.

Agentes crioprotetores penetrantes, substâncias que desempenha um dos papéis mais importantes no processo de criopreservação e sendo o glicerol o crioprotetor mais utilizado na congelação de espermatozóides de garanhões, há evidências de que esta substância seja tóxica ao espermatozóide, e parte desta toxicidade esta relacionada a injúrias bioquímicas e a danos osmóticos, resultando em uma resposta pós-descongelação, no que diz respeito a motilidade, integridade celular e fertilidade, bastante variável entre garanhões.

Diante do exposto a busca por agentes crioprotetores de menor toxicidade aos espermatozóides eqüinos torna-se uma alternativa, para atenuar a variação da congelabilidade na espécie.

Baseado em dados de literatura científica sobre a criopreservação de espermatozóides em diferentes espécies, os crioprotetores a base de Amidas trouxeram vantagens à reposta pós-descongelação, quando comparado ao glicerol, podendo estes se tornar uma alternativa viável para o processo de congelação de espermatozóides de garanhões.

O presente estudo objetivou comparar os crioprotetores a base de amidas em relação ao glicerol nos parâmetros pós-descongelação de:

1. Motilidade óptica.
2. Motilidade Computadorizada. (CASA).

3. Integridade da membrana celular através das sondas fluorescentes: Iodeto de Propídio e Acetato de Carboxifluoresceína.
4. Integridade acrossomal por análise ultraestrutural através de Microscopia Eletrônica de transmissão e fluorescência (FITC-PNA e Iodeto de Propídio).
5. Teste de fertilidade (Inseminação Artificial).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Comportamento das células espermáticas em baixas temperaturas

Para a fertilização do oócito, o espermatozóide necessariamente deverá manter atributos básicos como o metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, integridade acrossomal (contendo enzimas funcionais para a penetração no ovócito) e integridade das proteínas de membrana para ligação com o ovócito (Squires, 1999).

Entretanto, os protocolos de criopreservação expõem as células espermáticas a várias situações de estresse como as variações de temperaturas e exposição a temperaturas não fisiológicas, estresse osmótico pelos elevados gradientes de concentração de solutos do meio diluente de congelamento e pela formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular, os quais comprometem sua viabilidade (Watson, 2000).

A exposição das células espermáticas a temperaturas abaixo das fisiológicas, mesmo antes de ocorrer o congelamento (processo de estabilização das células espermáticas), é responsável por mudanças na organização bi-dimensional dos lipídios da membrana e também alteração das propriedades de enzimas encontradas entre a membrana, diminuindo a longevidade dos espermatozóides pós-descongelamento, através do adiantamento da capacitação espermática (Holt, 2000). O estresse sofrido pelos espermatozóides durante o processo de refrigeração é conhecido como choque frio, sendo sua sensibilidade variável entre espécies. Estudos correlacionam a suscetibilidade aos danos da refrigeração com a composição de lipídios da membrana entre as espécies, ou seja, espécies que contêm concentrações de esteróides baixa e concentrações de ácidos graxos polinsaturados alta, são mais predispostos aos danos do choque térmico (Darin-Bennett et al., 1973). Os espermatozóides de touros, carneiros e garanhões são altamente sensíveis ao choque frio em comparação a espermatozóides humanos e de coelhos que são relativamente resistentes (Critser et al., 1988; Watson, 1979, 1995). A severidade das injúrias celular é dependente da temperatura final e da taxa da queda da temperatura, afetando a estrutura e a função da membrana espermática. (Amann & Pickett, 1987).

Os lipídeos da membrana espermática são os componentes da membrana plasmática mais importante, quando se considera o efeito causado pela refrigeração.

Nos espermatozóides de garanhões a maiorias dos lipídeos são os fosfolipídeos e o colesterol, estando presentes numa proporção de 0,64: 0,36 respectivamente. (Parks & Lynch, 1992).

As membranas espermáticas apresentam-se num estado fluido, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções com plena eficiência. Os principais fatores que afetam esta fluidez são sua composição relativa entre fosfolipídeos e colesterol e a temperatura na qual a membrana é exposta. Com a queda da temperatura, os lipídeos passam por uma transição de estado fluido para um estado liquido cristalino, no qual as cadeias de ácidos graxos tornam-se desordenadas, com a continua queda de temperatura o estado de liquido cristalino é transformado em estado de gel no qual as cadeias de ácidos graxos organizam-se em um modelo paralelo, produzindo uma estrutura rígida, tornando estas áreas fracas, sujeita a rupturas, fusões e permeável a íons (Hammersted et al. 1990).

A rápida refrigeração do espermatozóide de garanhões da temperatura ambiente para 5°C induz a danos irreversíveis caracterizados por motilidade anormal, movimento circular, movimento retrógrado e perda rápida da motilidade, danos acrossomais, danos à membrana plasmática, metabolismo reduzido e perda de componentes intracelulares. Para os espermatozóides eqüinos a faixa de temperatura critica durante a refrigeração situa-se entre 19°C e 8°C (Moran et al., 1992).

Uma taxa de refrigeração lenta e a adição de substancias ao meio diluente de congelação como açucars, gema de ovo, lipoproteínas do leite, glicerol, BSA, álcool polivinil e lipossomas, danos às células espermáticas durante a fase de refrigeração (Pickett & Amann, 1987; Katila, 1997a; Katila et al., 1997b).

No entanto, as crioinjúrias mais significantes ocorrem durante os processos de congelação e descongelação (Holt, 2000a). O maior desafio celular não consiste em suportar baixas temperaturas e sim transpor uma faixa de temperatura variando de 0°C a -15°C, na qual a célula passa através da congelação e descongelação (Mazur, 1963; Drobnis et. al.,1993).

Quando as células espermáticas são refrigeradas a aproximadamente -5°C, as células e o meio extracelular permanecem não congelados, mas super refrigerados. Entre -5°C e -10°C, cristais de gelo começam a se formar no meio extracelular, mas o meio intracelular permanece não congelado e super refrigerado; presumidamente por causa da membrana plasmática que bloqueia o crescimento de cristais de gelo dentro do citoplasma (Critser,1999; Gao & Critser, 2000). A formação de gelo no meio extracelular faz com que aumente a concentração de solutos no meio extracelular,

elevando a pressão osmótica, causando saída da água do interior das células (Wolfe & Byant, 1999).

Oehinger et al. (2000), revisaram e relataram os efeitos da criopreservação sobre espermatozóides humanos, como perda da estabilidade da bicamada de lipídeos causado pela desidratação celular, alterações dos componentes da membrana celular, desnaturação de proteínas da membrana, alterações do metabolismo energético celular, lesões na membrana acrossomal, injúrias ao DNA e cristalização eutética dos solutos intracelulares levando a morte celular.

Os eventos físicos subseqüentes na célula dependem da taxa de congelação (Critser, 1999).

Se a célula for refrigerada rapidamente, esta não tem tempo suficiente para desidratar-se e manter o equilíbrio osmótico, tornando-se altamente refrigerada e com possibilidade de formação de cristais de gelo intracelular, o que pode causar danos irreversíveis à célula. (Muldrew & Mc Gann, 1994; Gao & Citser, 2000). Se por outro lado, se as células forem congeladas num ritmo mais lento, as células irão se desidratar por causa do meio extracelular super concentrado, eliminando a possibilidade de formação de grandes cristais de gelo intracelular, mas por outro lado, podendo sofrer danos morfofuncionais devido à desidratação celular (Mazur, 1963; 1990). Uma célula espermática que sobrevive a temperaturas abaixo de 0°C pode ainda sofrer mudanças comparáveis aquelas do congelamento durante o descongelamento que podem comprometer sua sobrevivência. Estes efeitos dependem, ou da taxa de congelação anterior ter induzido congelamento intracelular, ou desidratação celular. No caso de uma congelação rápida, uma descongelação também rápida poderá recuperar muitas células, possivelmente pela prevenção do nocivo crescimento de pequenos cristais intracelular pela recristalização (Mazur, 1990).

2.2. Agentes crioprotetores adicionados ao meio diluente de congelação

Os espermatozóides durante o processo de congelação são expostos a varias situações adversas a sua homeostase, podendo estas promover diversas injúrias a célula espermática (Watson, 2000; Gao & Critser, 2000; Critser & Mobraaten, 2000). A presença de algumas substâncias no meio diluente, altera as propriedades físicas do processo de congelação da solução (Viskanta et al., 1997; Wolfe & Bryant, 1999;

Karow, 2001) e bem como promovem alguma proteção aos espermatozóides no processo de criopreservação (Rowe, 1966; Holt, 2000).

Estas substâncias são denominadas agentes crioprotetores e são classificadas como agentes crioprotetores penetrantes e agentes crioprotetores não penetrantes (Rowe, 1966; Nash, 1966; Karow, 2001).

2.2.1. Agentes crioprotetores não penetrantes

Os agentes crioprotetores não penetrantes são representados por macromoléculas com alto peso molecular, tais como os açúcares, lipoproteína da gema do ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos, sendo estas substâncias responsáveis por um mecanismo de proteção no meio extracelular. Eles atuam através de um efeito osmótico, no qual induz a saída da água do interior da célula prevenindo a formação de cristais de gelo no meio intracelular (Amann & Pickett, 1987).

2.2.1.1. Açúcares

Os açúcares desempenham importantes papéis no meio diluente de congelação, atuando basicamente como substrato para a produção de energia pelos espermatozóides, na manutenção da pressão osmótica do diluente, aumentando a quantidade de água não congelada em temperaturas abaixo do ponto de congelação da água e reduzindo a concentração de sais na solução não congelada. (Holt, 2000).

Os açúcares mais comumente utilizados em meios diluentes para congelação de espermatozóides são: glicose, lactose, sucrose, rafinose, manose, trealose.

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

Dissacarídeos tais como, trealose e sucrose interagem com os grupos polares da membrana, promovendo assim uma estabilização da membrana espermática (Dalimata e Graham, 1997).

Estas interações envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxilas dos açúcares com os grupos fosfatos dos fosfolipídios da membrana. Pela reposição da

água ao redor das “cabeças” dos grupos de fosfolípidios, os açúcares podem prevenir os danos causados a membrana pela intensa desidratação (De Leeuw et. al., 1993). An et al. (2000) compararam o efeito crioprotetor de dissacarídeos (Sucrose e Trealose) e trissacarídeos (Rafinose e Melezitose) em sêmen congelado de camundongos e não encontraram diferenças significativas na taxa de sobrevivência dos espermatozóides. Yildiz et al.(2000), estudaram os efeitos da adição de diferentes tipos de açúcares (monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos) no meio diluente para congelação de espermatozóides de cães e obtiveram melhorias nos parâmetros de motilidade pós-descongelação com a adição de monossacarídeos (xilose e frutose) e melhores índices na percentagem de células vivas e integridade acrossomal quando se utilizou a trealose ($p<0,001$), concluindo que existem diferenças em relação ao mecanismo de ação entre os diferentes tipos de açúcares (monossacarídeos, dissacarídeos e trissacarídeos) e que a combinação entre os diferentes tipos pode trazer melhorias nos parâmetros espermáticos.

Sztein et al. (2001), constataram que os açúcares utilizados como agentes crioprotetores não penetrantes (trealose, sucrose e rafinose) para espermatozóides de camundongos, foram superiores ($p<0,001$) em relação aos agentes crioprotetores penetrantes (DMSO, propanediol, formamida e glicerol), nos parâmetros de motilidade, viabilidade e fertilidade.

2.2.1.2. Gema de ovo

A gema de ovo no meio diluente de criopreservação beneficia os espermatozóides por manter a pressão coloidal do meio e também por uma lipoproteína de baixa densidade, contida na gema de ovo, a qual estabiliza a membrana espermática durante a congelação e descongelação. (Foulkes,1977; Watson, 1990). Holt (2000), revisou os aspectos relacionados a congelação de sêmen e relatou que os efeitos crioprotetores da gema de ovo estão envolvidos com a porção lipoprotéica de baixa densidade a qual protege as células espermáticas do choque térmico, da fase de transição dos lipídeos e danos a membrana plasmática a temperaturas abaixo do ponto de congelação da solução. Cabrita et al.(1998) observaram que a integridade celular de espermatozóides de truta Arco Íris (*Oncorhynchus Mykiss*) congelados em meio diluente com gema de ovo foi superior ($p>0,001$) aos espermatozóides congelados em meio diluente que não continham gema de ovo (38% e 21% respectivamente). Dewit et al. (2000) obtiveram taxa de

fertilização de oócitos de camundongos, com espermatozóides criopreservados em meio diluente contendo 20% de gema de ovo comparáveis ao sêmen a fresco (68 e 72% respectivamente, $p > 0,05$.) e superiores ($p < 0,05$) aos outros meios diluentes tradicionais de congelação de camundongos. De Leeuw et al. (1993), concluíram que a gema de ovo desempenha um importante papel na criopreservação de espermatozóides de touros e constataram que a exclusão da gema de ovo dos meios diluentes contendo propanediol, sucrose ou sucrose com polivinilpirrolidone, levou a uma redução da porcentagem de células viáveis durante a refrigeração e congelação.

Vishwanath & Shannon (2000) relataram a ação protetora da gema de ovo nos espermatozóides bovinos contra os efeitos tóxicos do plasma seminal. Entretanto, ela também fornece substratos (aminoácidos aromáticos tais como a L-fenilalanina) para a produção de H_2O_2 pela liberação do aminoácido aromático oxidase (AAAO) pelas células mortas. A quantidade de gema de ovo necessária para promover a proteção contra os efeitos das toxinas do plasma seminal é proporcional a quantidade de plasma seminal no sêmen diluído. Desta forma, quanto mais diluído o sêmen, menor a concentração necessária de gema de ovo.

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

2.2.1.3. Proteínas do leite

O leite tem sido usado para a diluição e armazenamento do sêmen eqüino a fresco ou refrigerado. O primeiro potro nascido de espermatozóides colhido do epidídimo resultou de uma égua inseminada com sêmen congelado num meio diluente a base de leite (Barker & Gandier, 1957).

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

Batellier et al. (1997), estudaram os efeitos dos componentes do leite (fosfocaseinato, a-lactoalbumina, β -lactoglobulina e proteínas do soro do leite) em comparação a meios diluentes utilizados rotineiramente (INRA 82) e ao leite desnatado em suas diversas formas (UHT, desnatado, microfiltrado e ultrafiltrado) e verificaram que o fosfocaseinato foi o componente do leite mais eficiente em manter a sobrevivência dos espermatozóides de garanhões mantidos a 4°C e também foi mais eficiente ($p=0,07$) em relação ao INRA 82 quanto ao teste de fertilidade (60% e 36% respectivamente).

Os melhores resultados baseados em motilidade e integridade de membrana plasmática foram obtidos com um meio diluidor contendo 75% de leite desnatado e é sugerido que a inclusão no meio de mais de uma macromolécula tais como gema de ovo e leite poderá melhorar os resultados de espermatozóides eqüinos congelados (Braun et al. 1995).

2.2.1.4. Aminoácidos

Trimeche et al. (1996), concluíram que a glutamina na concentração de 80mM adicionada no meio diluente de congelação INRA 82, com ou sem glicerol, promoveu um melhora significativa nos parâmetros de motilidade espermática computadorizada para espermatozóides de Jumento *Poito*, quando comparado aos meios com concentrações de glutamina de 160 a 240mM ou aos meios diluentes onde a glutamina não foi adicionada. Na congelação de espermatozóides de garanhões utilizando os aminoácidos glutamina, prolina, histidina e betaína. Trimeche et al. (1999), constataram que a glutamina na concentração de 40mM foi superior ($p<0,05$) em relação a motilidade quando comparado com o controle sem a adição de aminoácidos no diluente de congelação (56% e 49,7% respectivamente) e glutamina e a prolina nas concentrações de 30 a 80mM foram similares nos parâmetros de motilidade e velocidade espermática (CASA).

Kundu et. al. (2001), compararam a eficácia crioprotetora de sete aminoácidos (prolina, glutamina, histidina, arginina, lisina, alanina e glicina) combinados com glicerol, DMSO e a combinação glicerol + DMSO, na congelação de espermatozóides da cauda do epidídimo de caprinos e os resultados evidenciaram um aumento do potencial crioprotetor do glicerol quanto ao percentual da motilidade progressiva combinado com os aminoácidos, alanina, glicina, glutamina e histidina. Concluindo que o mecanismo de ação destes aminoácidos baseia-se na hipótese destas moléculas

serem eletricamente carregadas e interajam eletrostaticamente com os grupos fosfatos da membrana plasmática, formando uma camada na superfície dos espermatozoides e melhorando a ação crioprotetora do glicerol.

Aisen et al. (1990) observaram que a glicina, quando utilizada em meio diluído, pode ser metabolizada pelos espermatozoides e participar como substrato na via glicolítica e no processo de oxidação celular, proporcionando uma maior sobrevivência das células espermáticas.

A substituição do citrato tamponado por glicina ou a sua adição ao citrato tamponado prolonga a sobrevivência dos espermatozoides ovinos durante a refrigeração a 4° C.

2.2.2. Agentes crioprotetores penetrantes

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

Os crioprotetores penetrantes possuem um mecanismo de ação baseado em suas propriedades coligativas ou propriedades de ligação com a molécula da água. Esta propriedade modifica as características da molécula da água durante o processo de congelamento, limitando a formação de cristais de gelo, retardando o crescimento dos cristais e reduzindo as concentrações de soluto no meio extracelular, como no meio intracelular. (Rowe, 1966; Nash, 1966; Watson, 1979; Dalimata & Graham, 1997). Numa solução fisiológica contendo glicerol, uma maior quantidade das moléculas de água permaneceu não congelada, como ocorre na refrigeração, do que numa solução sem glicerol, aumentando assim a quantidade de canais de solvente não congelado e diminuindo a concentração de sais na porção não congelada (Mazur, 1980).

Os agentes crioprotetores penetrantes têm estruturas as quais promovem ligações de hidrogênio com a molécula da água, estas ligações mudam a orientação

da molécula da água nos cristais de gelo criando um ambiente menos nocivo para as células espermáticas (Dalimata e Graham, 1997). Estas ligações de hidrogênio também promovem uma estabilização da conformação das proteínas quaternárias da membrana contra desidratação (Karow, 2001). Os crioprotetores também interagem direta ou indiretamente com a membrana celular, estabilizando a estrutura do complexo terciário água, lipídeo e proteína. (Rowe, 1966).

2.2.2.1. Glicerol

O glicerol é quimicamente classificado como um álcool, por seus grupos hidroxilas e sendo composto por três carbonos.

Lovelock & Polge (1954), propuseram que o mecanismo de ação do glicerol seja baseado em suas propriedades coligativas e a depressão do ponto de congelação e a conseqüente queda da concentração de eletrólitos das frações não congelada da solução, protegendo as células espermáticas dos efeitos nocivos da solução super saturada durante o processo de congelação.

O glicerol contém três grupos funcionais de hidroxila (contendo oxigênio) que podem aceitar um hidrogênio da molécula da água em seis sítios diferentes.

A doação de átomos de hidrogênio, em lugar de aceitação de um átomo de hidrogênio, é um outro mecanismo pelo qual os crioprotetores podem interagir com a molécula da água. O glicerol pode doar três átomos de hidrogênio os quais podem interagir com a molécula da água. A habilidade de um crioprotetor se ligar com o hidrogênio da molécula da água é mais importante do que a doação de um átomo de hidrogênio por parte do crioprotetor. (Nash, 1966).

No entanto os álcoois, os quais contem os radicais hidroxilas, tem a tendência de efetuarem ligações entre si, diminuindo a probabilidade de ligações entre as moléculas da água, o qual é uma característica desfavorável em processos de criopreservação celular. (Wowk et al. 1999).

Uma outra hipótese do mecanismo de ação do glicerol é a ligação dos átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila do glicerol com os átomos de oxigênio dos grupos fosfatos dos fosfolipídios da membrana plasmática dos espermatozoides promovendo assim, uma estabilização da membrana durante o processo de congelação.(Kundu et al., 2000).

O glicerol é o crioprotetor penetrante mais comumente utilizado nos meios de congelação de sêmen de garanhões em uma concentração variando 2 a 5% (Keith,

1999). No entanto, diversos trabalhos têm demonstrado ser este crioprotetor deletério ao espermatozóide de diferentes espécies. Estes efeitos tóxicos do glicerol têm sido reportado por vários autores e revisados por Fahy et al. (1990). A toxicidade do glicerol pode resultar em desnaturação de proteínas, alteração de interações da actina e indução da liberação das proteínas do seu local na membrana. Hammerstedt & Graham (1992) revisaram outros efeitos causados pelo glicerol incluindo: mudanças nos eventos citoplasmáticos, devido o aumento da viscosidade intracelular pelo glicerol, alteração da polimerização da tubulina, alteração da associação dos microtúbulos, efeitos no balanço bioenergético, alteração direta na membrana plasmática, alteração do glicocálix e proteínas superficiais da célula espermática. Ball & Vo (2001), estudaram a tolerância osmótica do espermatozóide eqüino, quanto à adição e remoção dos crioprotetores, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol e glicerol, e concluíram que a adição e remoção do glicerol resultaram em um maior estresse osmótico, caracterizado por uma redução de motilidade, diminuição da integridade celular e acrossomal, quando comparado aos outros crioprotetores avaliados.

Pace & Sullivan (1975) também observaram que as taxas de prenhez por égua foram mais altas para éguas inseminadas com sêmen diluído em meio sem glicerol (50%) do que sêmen diluído em meio contendo 7% de glicerol (35%). Um decréscimo acentuado da fertilidade de sêmen de garanhões refrigerados em meio diluente contendo glicerol por um período de duas horas, foi evidenciado por Demick et al.(1976).

Panayota et al. (1998) constataram uma redução significativa ($p<0,05$), nas características espermáticas de motilidade e viabilidade de membrana espermática pelo teste hipoosmótico em espermatozóides humanos congelados em meio diluente contendo 12% de glicerol em comparação a 8% de glicerol. A exposição dos espermatozóides humanos num meio crioprotetor com glicerol por menos de 15 minutos causou redução na motilidade. (Critiser, et al., 1998). Hay, et al. 1997, concluíram que a adição do glicerol no meio do congelamento de sêmen de cães não promoveu nenhuma mudança no *status* acrossomal ou na motilidade, mas resultou um declínio na ligação de espermatozóides em oócitos caninos.

Uma diminuição na fertilidade de espermatozóides de galos foi observada, devido à adição do glicerol. A adição de metil-celulose reduziu o efeito contraceptivo do glicerol, quando se inseminou com sêmen a fresco, mas não manteve a

capacidade fertilizante do espermatozóide congelado e descongelado quando foi usada uma combinação de 3 a 4% de glicerol (Phillips et. al 1996).

Fiser & Fair Full (1990) analisaram os efeitos combinados da concentração do glicerol e a velocidade de refrigeração na motilidade e integridade acrossomal de espermatozóides de suínos e evidenciaram que aumentando o nível do glicerol acima de 6%, houve em uma diminuição gradual na motilidade espermática.

A presença do glicerol no meio melhorou a sobrevivência dos espermatozóides de carneiros, mas produziu significativa deteriorização acrossomal (Watson & Martin, 1975).

A inclusão do glicerol no meio tris-glicina gema de ovo para espermatozóides de suíno deprimiu a utilização e oxidação da glicose, sem influenciar o consumo total de oxigênio dos espermatozóides e causou vesiculação acrossomal (Murdoch & Jones 1978).

2.2.2.2. Etilenoglicol

O etilenoglicol, também é quimicamente classificado 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, 2000).

Mercante et al., (1995), estudaram a eficiência *in vitro* do glicerol e etilenoglicol como agentes crioprotetores na congelação de espermatozóides de garanhões, e constaram uma similaridade na motilidade e vigor entre os crioprotetores porém, com uma tendência de melhoria com a utilização do etilenoglicol. Neves Neto et al., (1995), utilizando o glicerol e o etilenoglicol adicionados ao meio de congelação a base de Lactose-EDTA-gema de ovo, na concentração de 5%, na criopreservação de sêmen de garanhões, obtiveram uma taxa de prenhes de 37,5% para o grupo etilenoglicol (3/8) e 12,5% para o grupo glicerol, porém este resultado não foi significativo devido o numero restrito de animais inseminados.

Em um estudo onde se comparou a eficácia crioprotetora do etilenoglicol e do glicerol e o método de acondicionamento do sêmen de garanhões (palhetas de 0,5 ml e macrotubo de 4ml), Alvarenga et al. (2000) constataram uma melhoria na motilidade pós-descongelação ($p < 0,05$) com a utilização de etilenoglicol para sêmen de

garanhões na concentração de 5% em relação ao glicerol na mesma concentração (36,50% e 34,25%, respectivamente).

Arruda (2000), constatou uma interação entre meio diluente de congelamento e crioprotetor, utilizando os meios de congelamento Lactose-EDTA, INRA82 e meio a base de leite desnatado e os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. Este observou que com a utilização do meio diluente Lactose- EDTA-gema de ovo, os crioprotetores não apresentaram diferenças estatísticas entre as avaliações efetuadas, contudo com a utilização dos meios INRA82 e do meio diluente de congelamento a base de leite o etilenoglicol apresentou uma tendência de melhoria nos parâmetros avaliados.

2.2.2.3. DMSO (Dimetilsulfóxido)

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 uma molécula de DMSO (3:1) e 2 moléculas de água para uma de DMSO (2:1) e seu radical sulfóxido (S=O) tem a capacidade de formar fortes ligações de hidrogênio com os grupos OH, diminuindo assim o ponto de congelamento da solução (Murthy, 1998). O DMSO também atua como uma molécula eletricamente carregada, o qual interage eletrostaticamente com os grupos fosfatos das membranas internas e externas dos espermatozoides, promovendo uma certa proteção contra os eventuais danos causados pela criopreservação (Kundu et al., 2000).

Chenier et al., (1998) num estudo onde se comparou a eficácia dos crioprotetores (glicerol, etilenoglicol, dietilenoglicol, propilenoglicol e DMSO), conclui-se que o etilenoglicol deprimiu a motilidade progressiva dos espermatozoides de garanhões pós - descongelamento, comparado com o glicerol ou DMSO e os espermatozoides congelados com dietilenoglicol e propilenoglicol tem uma baixa motilidade e viabilidade do que os outros crioprotetores. No teste de fertilidade, sete éguas das nove inseminadas com sêmen do tratamento DMSO conceberam (78% de taxa de fertilidade). No entanto, Songsasen et al. (2002) notaram que o DMSO foi extremamente tóxico para espermatozoides de cães.

Landim-Alvarenga et al. (2001), relataram que o DMSO na concentração de 1,0M foi menos efetivo ($p<0,05$) em relação ao glicerol (0,55M) nos parâmetros de motilidade total e progressiva computadorizada (25,8% e 12,6%, 42,1% e 23,1% respectivamente), e diferenças de resultados similares foram observados em relação à viabilidade celular (citometria de fluxo) e integridade acrossomal (Microscopia

eletrônica de transmissão). O DMSO na concentração de 10% teve um melhor efeito crioprotetor para integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial ($p < 0,05$), em espermatozoides congelados de Truta Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss*) quando comparado ao glicerol, dimetilacetamida, metanol e propilenoglicol, nas concentrações de 5, 10 e 15%. (Ogier de Baulny et al., 1997). Cabrita et al. (1998), não constataram diferenças em relação à viabilidade celular com os crioprotetores DMSO e dimetilacetamida em sêmen congelado de Truta Arco-Íris (*Oncorhynchus mykiss*). No entanto fertilidade somente foi observada com espermatozoides criopreservados com DMSO.

2.2.2.4. Amidas

As amidas são formadas por dois grupos funcionais, um grupo amina (contendo nitrogênio) e um grupo ácido carboxílico (contendo oxigênio). As amidas podem aceitar hidrogênio da água em três sítios de ligação, tendo a metade dos sítios de ligação de hidrogênio com a molécula da água em comparação ao glicerol. No entanto as amidas possuem uma menor viscosidade e solubilidade a água em relação ao glicerol, permitindo-as uma maior permeabilidade de membrana (Nash, 1966), diminuindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causados pelos crioprotetores (Ball & Vo, 2001). Keith (1998) relatou que adições de grupos metil nas moléculas de acetamida e formamida foram mais efetivos quanto à capacidade crioprotetora comparado a moléculas sem o grupo metil, sugerindo assim que a estrutura da molécula das amidas determinam parcialmente sua habilidade crioprotetora.

Nagase et. al. (1972), concluíram que a formamida e a lactamida promoveram uma boa crioproteção em espermatozoides de touros. Hanada & Nagase (1980) concluíram que inseminações feitas com sêmen congelado de coelhos com 1,0M de DMSO, lactamida ou acetamida obtiveram taxas de fertilização de 79, 68 e 88%, respectivamente, com a média de nascimento de 3 a 5 filhotes.

Keith (1998) estudou varias formas de amidas (formamida, metilformamida, dimetilformamida, acetamida e metilacetamida) como agente crioprotetor em comparação com o glicerol em meio usado para congelamento de sêmen de garanhões, encontrou que a metilformamida (0,9 M) foi superior em manter o motilidade total dos espermatozoides de garanhões no tempo 0 pós-descongelamento em relação ao glicerol 0,55 M (54,2% a 51,6% respectivamente) e no tempo 20 (min)

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

Alvarenga et al. (2000), estudaram a eficácia dos crioprotetores glicerol, etilenoglicol, DMSO e dimetilformamida, e concluíram que o DMSO foi inferior nos resultados de motilidade total e progressiva em relação aos demais tratamentos (42,1% e 23,1%, 40,9% e 22,8%, 25,8% e 12,6%, 50,6% e 22,2% respectivamente). Graham (2000), obteve resultados de motilidade inferiores ao glicerol ($p < 0,05$), utilizando os crioprotetores acetamida, metilacetamida, formamida, metilformamida, dimetilformamida na concentração de 0,55M (60, 8, 20, 5, 40 e 37% respectivamente). No entanto, em um segundo experimento onde se utilizou os crioprotetores etilenoglicol, metilformamida, dimetilformamida nas concentrações de 0,6 e 0,9M em comparação ao glicerol a 0,6M, o crioprotetor metilformamida a 0,9M obteve um resultado em relação a motilidade superior aos demais tratamentos ($p < 0,05$).

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

Dalimata & Graham (1997), obtiveram melhorias significativas na percentagem de espermatozoides móveis de coelhos pós-descongelamento, utilizando acetamida em comparação ao glicerol, DMSO, associação entre glicerol e DMSO e etilenoglicol (17%, 2%, 1%, 2% e 1%, respectivamente).

Tselutin et al. (1995) analisaram o efeito da fertilidade de sêmen de patos, gansos, perus e galos criopreservados a -196°C , tendo como crioprotetor dimetilacetamida e após inseminação artificial obtiveram uma taxa de fertilidade entre 69 – 90%, 81 – 90% e 75 – 85% respectivamente. Chalah et al.(1999) relataram altas taxas de fertilização com sêmen de galo congelado com dimetilacetamida, quando comparado com o glicerol.

Dimetilacetamida provou ser o melhor crioprotetor para o congelamento de sêmen de galos não tendo nenhum efeito nocivo significativo na eclosão dos ovos ou defeitos embrionários específicos e podendo ser usado sem sua remoção antes da inseminação artificial (Lake & Ravie 1984).

Tselutin et al., (1999) também conseguiram altas taxas de fertilidade (84,7% a 92,7%) com sêmen de galos congelados com dimetilacetamida.

Kazuko et al. (1997) obtiveram altas taxas de fertilidade e eclodibilidade, utilizando a dimetilformamida (96% e 84% respectivamente) em comparação ao DMSO (60% e 71% respectivamente), na criopreservação de espermatozóides do peixe Medaka (*Oryzias Latipes*).

Ogier de Baulny et al. (1999) num estudo onde foram comparados diferentes crioprotetores como DMSO, Dimetilacetamida, Glicerol, Metanol e Propilenoglicol, concluíram que em relação a integridade de membrana, atividade mitocondrial, conteúdo de ATP e motilidade nos espermatozóides de Catfish Europeu (*Silurus glanis*) depois do congelamento a dimetilacetamida proveu os melhores resultados, causando estimulação direta na produção de ATP o que é um fator decisivo na resistência do congelamento do espermatozóide de Catfish Europeu.

2.3. Método de avaliação da qualidade do sêmen eqüino pós-descongelação

2.3.1. Avaliação da motilidade espermática

A motilidade espermática avaliada por microscopia óptica tem sido considerada um dos critérios de maior importância na avaliação da fertilidade do sêmen. Esta técnica apresenta vantagens por ser barata e de simples realização, porém trata-se de uma avaliação subjetiva que pode sofrer variações nos resultados dependendo da experiência do examinador. O objetivo desta avaliação é determinar a proporção de espermatozóides móveis e bem como a proporção de espermatozóides com movimento progressivo (Malmgren, 1997). Ferreira (2000), comparou as metodologias de análise da motilidade espermática subjetiva, de espermatozóides de garanhões, por microscopia óptica e através da visualização do movimento espermático no monitor do aparelho Hamilton Thorn Motility Analyser (HTMA) com a motilidade espermática computadorizada (HTMA). Dentre as variáveis, garanhões e meio diluente, e encontrou uma elevada correlação positiva entre os resultados da avaliação subjetiva ao microscópio óptico e computadorizada da motilidade espermática total ($r=0,89$) e desta última com a avaliação subjetiva ao monitor do HTMA ($r=0,89$), concluindo que a avaliação subjetiva da motilidade espermática constitui um método seguro para a determinação do percentual de espermatozóides móveis.

A análise computadorizada dos espermatozóides tem sido utilizada para determinar as características do movimento espermático (Blach et al., 1988; Jasko et al., 1988, Varner et al., 1991). O Hamilton Thorn (HTM) consiste em um aparelho composto de um microscópio com contraste de fase, um digitalizador de imagens e um computador que além das mensurações da motilidade total e progressiva dos espermatozóides são avaliadas características como a linearidade, velocidades espermáticas, percentagem de espermatozóides rápidos deslocamento, lateral da cabeça dos espermatozóides entre outras (Jasko et al., 1992). Anzar et al. (1991), encontraram uma alta correlação entre o declínio da motilidade espermática e o aumento da percentagem de células mortas adicionadas as amostras de sêmen, verificando que o HTM (2030) apresentou uma alta precisão na avaliação das amostras de sêmen de touros.

2.3.2. Avaliação da integridade da membrana plasmática

Muitas técnicas de coloração têm sido desenvolvidas para detectar injurias na membrana plasmática de espermatozóides. O princípio destas técnicas consiste na exclusão das células com a membrana comprometida, pois os corantes em sua maioria, são impermeáveis a membrana intacta tendo uma afinidade pelo núcleo celular (Graham, 1996, Magistrini et al., 1997). A combinação de sondas fluorescentes, tais como o Iodeto de Propídio e o Diacetato de Carboxifluoresceína têm sido investigados para a avaliação da viabilidade espermática (Garner et al., 1986; Harrison e Vickers, 1990; Graham, 1996; Magistrini et al., 1997). O Iodeto de Propídio, o qual se liga e cora o DNA celular de vermelho, é impermeável a membrana celular, penetrando na célula e desempenhando sua função somente em células com a membrana lesada. O Diacetato de Carboxifluoresceína por outro lado é permeável a célula, sendo deesterificada por esterases não específicas resultando em Carboxifluoresceína livre a qual, liga-se a membranas celulares intactas, causando uma fluorescência verde (Harrison e Vickers, 1990).

Zúccari (1998), trabalhando com espermatozóides eqüinos, verificou correlações existentes entre as variáveis, motilidade, vigor e integridade da membrana plasmática através da utilização das sondas fluorescentes, Iodeto de Propídio e Diacetato de Carboxifluoresceína, após a descongelação e durante o teste de termo - resistência.

2.3.3. Avaliação da integridade acrossomal

A integridade acrossomal é uma das características fundamentais no processo de fertilização. No processo de congelamento e descongelamento a célula espermática pode sofrer danos que comprometam a integridade do acrossoma e bem como sua funcionalidade. Lecitinas, como a aglutinina *Psium sativum* (PSA) e *Arachis hypogea* (PNA), conjugadas a fluorocromos (FITC), as quais ligam-se especificamente na membrana acrossomal externa dos espermatozoides, mais especificamente nos terminais dos resíduos das glicoproteínas, a- D glucose e a -D manose tem sido amplamente utilizadas para a avaliação do *status* acrossomal em diferentes espécies animais, bem como em humanos (Cross et al., 1986). O FITC-PSA e o FITC-PNA utilizados sem uma prévia permeabilização das células espermáticas permite uma avaliação das injúrias da membrana acrossomal dos espermatozoides, ou seja, espermatozoides com alguma lesão acrossomal ou sofrendo reação tornam-se fluorescentes sobre o ápice do acrossoma e região equatorial, enquanto que espermatozoides com membrana acrossomal intacta, impermeáveis as lecitinas, não apresentam fluorescência (Farlin et al.,1992; Zahn, 2001; Ponchirolli, et al.,2002).

A avaliação ultra-estrutural de espermatozoides através microscopia eletrônica de transmissão, permite análises altamente precisas de injúrias celulares que comprometem a fertilidade sem alterações aparentes em outras características celulares. Christensen et al. (1995) compararam o *status* acrossomal de amostras de sêmen a fresco e congelados de garanhões e encontraram diversas alterações acrossomais, de peça intermediária e axonema da peça principal, principalmente em amostras congeladas e descongeladas, concluindo que as lesões encontradas foram resultantes da desidratação celular e estresse osmótico, decorrentes dos processos de congelamento e descongelamento.

Alvarenga et al. (2000), avaliaram a integridade acrossomal por microscopia eletrônica de transmissão de espermatozoides equinos congelados com glicerol e etilenoglicol em palhetas francesas (0,5ml) e macrotubos alemães (4ml) e relataram que as lesões acrossomais encontradas em maior frequência no experimento foram à ondulação da membrana acrossomal externa, protuberância acrossomal e perda da densidade e homogeneidade do conteúdo acrossomal. Landim-Alvarenga et al. (2001), obtiveram um percentual de 25% e 23% de integridade acrossomal, avaliados através de microscopia eletrônica de transmissão, em espermatozoides equinos criopreservados utilizando o glicerol e o DMSO respectivamente. Constatando nas

amostras onde se utilizou o DMSO, uma ligeira ondulação na membrana acrossomal externa, e uma baixa eletro-densidade do conteúdo acrossomal, as mesmas alterações foram observadas quando utilizou-se o glicerol, porém neste grupo as células exibiram uma maior incidência de perda total do acrossoma.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu – São Paulo.

3.1. Experimentos

A pesquisa foi desenvolvida em dois experimentos: Experimento I, Experimento II.

3.1.1. Experimento I

Neste experimento objetivou-se testar diferentes formas de amidas como agentes crioprotetores em comparação ao glicerol a 5%. Os tratamentos de crioprotetores foram divididos em: DA1- dimetilacetamida a 1% (v/v), DA3-dimetilacetamida a 3% (v/v), DA5-dimetilacetamida a 5%, MF5- metilformamida a 5% (v/v), DF5-dimetilformamida a 5% (v/v) e GL5- glicerol a 5%.

Foram avaliados os parâmetros de motilidade total óptica, motilidade progressiva óptica, vigor, análise computadorizada do movimento espermático, percentagem de células integras através de sondas fluorescente, análise ultraestrutural da integridade acrossomal através de microscopia eletrônica de transmissão e fluorescência (FITC – PNA e Iodeto de propídio) e bem como o teste de fertilidade.

3.1.2. Experimento II

Como no Experimento I, o tratamento DF5, apresentou uma tendência de melhora na resposta pós-descongelção, nos parâmetros *in vitro* avaliados, em comparação com aos demais crioprotetores, neste experimento objetivou-se observar os efeitos pós-descongelção, nos parâmetros de motilidade total óptica, motilidade progressiva óptica, vigor, análise computadorizada do movimento espermático e percentagens de células integras (sondas fluorescentes), das associações entre os crioprotetores glicerol e dimetilformamida em comparação com a dimetilformamida e o glicerol isoladamente. Utilizaram-se os seguintes tratamentos de crioprotetores: TRAT. I -1,5% de dimetilformamida (v/v) + 3,5% de glicerol (v/v), TRAT. II- 3,5% de dimetilformamida

(v/v) + 1,5% de glicerol (v/v), TRAT. III - dimetilformamida a 5% (v/v) e TRAT. IV - glicerol a 5% (v/v).

3.2. Animais

Para a congelação e análises do sêmen foram utilizados 20 ejaculados de 10 garanhões (dois ejaculados de cada garanhão), para realização do experimento I (utilização de diferentes tipos de amidas na congelação de sêmen de garanhões) e para o experimento II (utilização de associações de dimetilformamida com glicerol). Os garanhões utilizados nos experimentos pertenciam a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Campus de Botucatu - São Paulo e de Haras localizados nos municípios de Itatinga – S.P, Bauru – S.P e Orlândia – S.P.

Os animais apresentavam-se na faixa etária de 7 a 15 anos, bom estado de saúde e eram pertencentes às raças Árabes, Quarto de Milha, Mangalarga, Brasileiro de Hipismo, Holsteinner, Trakehner e Westfalen. Foram selecionados, para entrarem no programa de congelação, animais que possuísem motilidade espermática total do sêmen a fresco igual ou superior a 60% (analisado através de Microscopia Óptica).

A colheita do sêmen foi realizada com uma vagina artificial modelo Botucatu (Papa & Alvarenga, 1987) e auxílio de uma égua em cio, devidamente contida.

No experimento I para o teste de fertilidade, foi utilizado o sêmen de um único garanhão, que apresentou uma baixa resposta pós-descongelação no tratamento GL 5 (glicerol a 5%). Foram utilizadas 15 éguas da raça Brasileiro de Hipismo e Mangalarga, para cada tratamento (DF5% e GL5%) com idades variando de 5 a 10 anos, bom estado corporal, histórico de fertilidade conhecido e sendo também submetidas à avaliação uterina por ultra-sonografia.

3.3. Análise e Processamento do sêmen a fresco

Após a colheita, o sêmen foi levado ao laboratório, sendo imediatamente filtrado para retirada da fração gel e posteriormente analisados os parâmetros de volume, cor, aspecto, motilidade total óptica, vigor espermático e concentração através de câmara de Neubauer.

A análise da motilidade óptica foi realizada segundo a metodologia descrita por Malmgren (1997), que consiste na deposição de uma gota de sêmen sobre uma lamina histológica aquecida a 38°C, recobrimo-a com uma lamínula (22 x 22mm) e sendo a

motilidade avaliada com auxílio de um microscópio óptico de contraste de fase sob o aumento de 200X sendo o resultado emitido em percentual (0 a 100%), além da motilidade a qualidade e a intensidade do movimento espermático denominado vigor também pôde ser avaliado e os resultados emitidos em escala de 0 a 5.

A concentração foi inferida com auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico sob o aumento de 200X, utilizando o fator de diluição de 1 parte de sêmen para 20 partes de água destilada. O número de espermatozóides contados foram multiplicados por 1000 e expressos em número de espermatozóides por milímetro cúbico (mm^3).

Após as avaliações o sêmen foi diluído em meio diluente de centrifugação a base de leite desnatado (Kenney, 1975), (Anexo – 1), na proporção de uma parte de sêmen para uma parte de meio diluente para centrifugação (1:1).

No experimento I, o sêmen foi dividido em seis tubos cônicos de centrifuga, referentes aos diferentes tratamentos utilizados: DA1%, DA3%, DA5%, MF5%, DF5%, GL5%.

No experimento II, o sêmen foi dividido em quatro tubos cônicos de centrifuga (15ml), referente aos diferentes tratamentos utilizados: TRAT. I (1,5% de DF + 3,5% de GL); TRAT. II (3,5% de DF + 1,5% de GL); TRAT. III (5% de DF); TRAT. IV (5% de GL).

Tanto no Experimento I como no II, o sêmen foi centrifugado a uma força de centrifugação de 600xg por 10 minutos.

Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* (espermatozóides sedimentados), foram diluídos com os diferentes meios de congelação referentes aos experimentos I e II.

3.4. Crioprotetores e meio diluente utilizados na congelação das amostras de sêmen nos experimentos I e II.

Foram utilizados os seguintes crioprotetores; N N Dimetilformamida¹ ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$), N Metilformamida² ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}$), N N Dimetilacetamida³ ($\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}$) e glicerol⁴ ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), com peso molecular de 73,09, 59,07, 87,12 e 92,09 respectivamente.

O meio diluente para congelação utilizado foi o INRA 82 (Palmer, 1984) (Anexo – 2), acrescido das associações de crioprotetores e crioprotetores referentes ao experimento I ou dos crioprotetores do experimento II.

¹ D 4254 – Sigma

² M 2769 – Sigma

³ D 5511 – Sigma

A análise dos meios diluentes acrescidos dos crioprotetores apresentaram os seguintes valores de pH e Osmolaridade (mOsm). Anexo-3.

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

Após a diluição com os meios diluentes de congelação dos experimentos I e II, as amostras de sêmen dos diferentes tratamentos foram acondicionadas em palhetas de 0,5 ml numa concentração de 100 milhões de espermatozóides por palheta (200 milhões de espermatozóides/ml), sendo em seguida as palhetas colocadas em geladeira regulada na temperatura de 5°C, as quais permaneceram por um período de uma hora.

Posterior a período de estabilização em geladeira, as palhetas foram colocadas a 6 cm do nível do nitrogênio em caixa de isopor de aproximadamente 40 litros, por um período de 15 minutos, após este período as palhetas foram mergulhadas em nitrogênio líquido e estocadas em botijão de nitrogênio para posterior análise.

3.6. Descongelação das amostras

As amostras, do experimento I e do experimento II, foram descongeladas em banho Maria a uma temperatura de 46°C/20 segundos e posteriormente colocadas a 37°C, sendo em seguida submetidas aos diferentes tipos de análises e os dados anotados em fichas apropriadas para posterior processamento.

3.6.1. Experimento I

3.6.1.1. Análise da motilidade espermática por microscopia óptica

A análise da motilidade por microscopia óptica foi efetuada, com auxílio de um microscópio com contraste de fase em aumento de 200x, seguindo a metodologia descrita por Malmgren (1997). Os parâmetros observados foram de Motilidade Total, Motilidade Progressiva (expressos em percentagem) e Vigor numa escala de 0 a 5.

3.6.1.2. Análise Computadorizada do movimento espermático

Para a análise computadorizada do movimento espermático utilizou-se o equipamento HTM – VOS – 10 e uma câmara de Makler aquecida a 38°C, tendo sido analisado um número mínimo de 500 células num total de cinco campos.

Os parâmetros avaliados foram os de motilidade total (MTH) e motilidade progressiva (MPH) expressos em percentagem, VAP (velocidade espermática ao longo de uma trajetória média, expresso em $\mu\text{m}/\text{segundos}$), VSL (velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea com origem no primeiro ponto analisado e final no último, expresso em $\mu\text{m}/\text{seg.}$), VCL (velocidade espermática real, expresso em $\mu\text{m}/\text{seg.}$), LIN (linearidade, expresso em percentagem), Rápidos (percentual de espermatozóides rápidos). O ajuste do aparelho para realização das análises está expresso no Anexo –4.

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

Utilizaram-se as sondas Diacetato de Carboxifluoresceína* e o Iodeto de Propídio**, segundo a técnica descrita por Harrison & Vickers (1990) e modificada por Zúccari (1998).

Uma alíquota de sêmen de 10 μl foi diluída em 40 μl da solução de trabalho (Anexo 6), preparada a partir de uma solução de estoque (Anexo 5).

A avaliação foi realizada com o auxílio de um microscópio de epifluorescência (BX 60, Olympus América INC, através de excitação em filtro BW) sob aumento de 1000X com óleo de imersão. Foram contadas 200 células em uma mesma lâmina e classificadas como integras e lesadas, conforme sua coloração.

Íntegros = Espermatozóides corados em verde, em toda sua extensão.

Lesados = Espermatozóides corados em vermelho.

3.6.1.4. Análise ultraestrutural da integridade acrossomal através de microscopia eletrônica de transmissão

A análise ultraestrutural de integridade acrossomal através de Microscopia Eletrônica de transmissão do sêmen foi feita de amostras de cada tratamento (*pool* de amostras) dos diferentes tratamentos (crioprotetores). Os espermatozóides foram

* C 5041 – Sigma

** P 4170 – Sigma

fixados em glutaraldeído a 4% + sucrose a 4% + 0,12% de CaCl_2 em 0,1 M de cacodilate tamponado (pH 7,4) e lavado através de centrifugação no mesmo tamponante. As amostras então foram pós-fixadas em 1 tetróxido de osmium a 1% por 3 horas a 4°C. Após esta etapa as amostras foram lavadas em água duplamente destilada, e desidratada usando altas concentrações de acetona, então os espermatozóides foram incluídos em 502 Araldite® por 72 horas a 60°C. Cortes ultrafinos foram obtidos usando uma navalha de diamante e estes cortes foram montados em grade de cobre, coradas com acetato de urânio e citrato de chumbo e examinadas usando um Microscópio Eletrônico de transmissão Phillips E.M.301. O exame ultra-estrutural das amostras foi de maneira aleatória e uniforme para minimizar os erros. Foram avaliadas 100 seções longitudinais da cabeça espermática para exame do acrossomo e região pós-acrossomal.

3.6.1.5. Avaliação da integridade acrossomal através de sondas fluorescentes (FITC – PNA e Iodeto de Propídio)

A solução de trabalho utilizada neste experimento foi semelhante à utilizada na avaliação da integridade de membrana, descrita na tabela 2, com a substituição da solução de estoque de CFDA, na mesma quantidade (20µl) da solução de estoque de FITC – PNA*, segundo proposto por Ponchiroli et al., 2001.

A avaliação foi realizada com auxílio do mesmo equipamento das análises de integridade de membrana, descritas no Experimento I.

Os espermatozóides foram classificados de acordo com quatro padrões de coloração:

- Mortos não reagidos: Corados com o PI (Vermelho).
- Mortos reagidos: Corados de verde na região acrossomal pelo FITC-PNA e vermelho pelo PI.
- Vivos não reagidos: não apresentavam nenhum padrão de coloração, sendo estes avaliados sem a luz fluorescente.
- Vivos reagidos: apresentava somente a região apical do acrossoma corado pelo FITC-PNA.

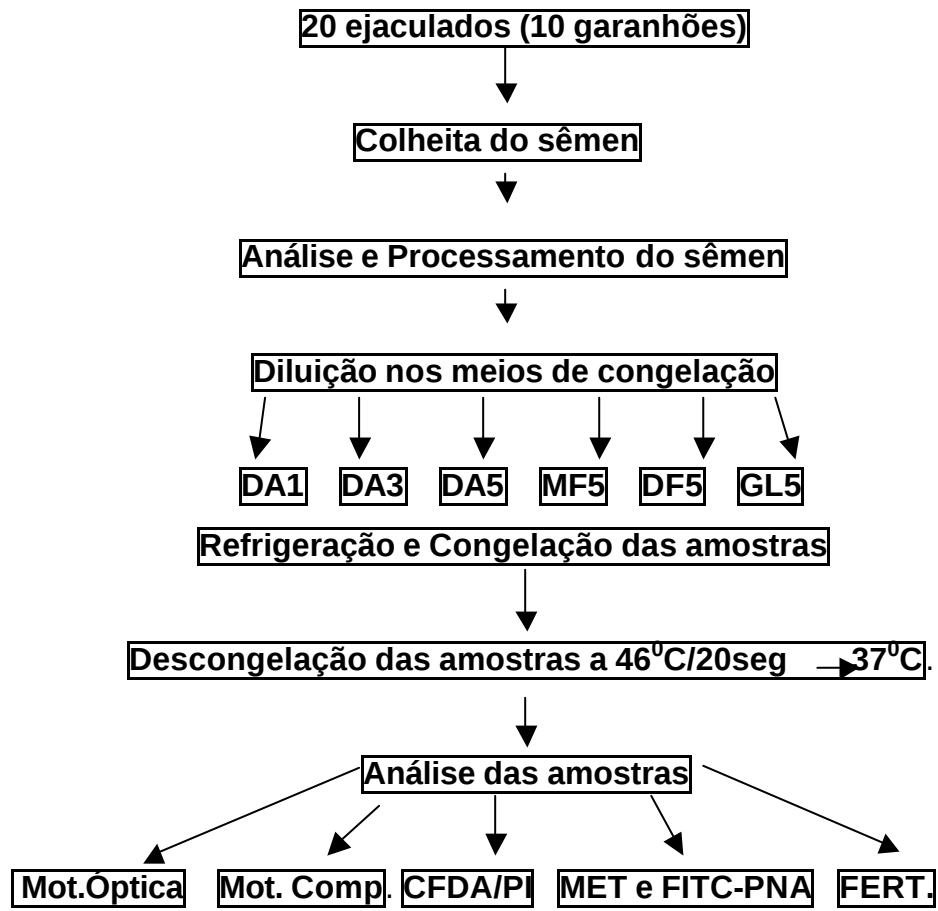
* Conjugado de Lecitina de *Arachis Hypogaea* L 7381 – Sigma

3.6.1.6. Teste de Fertilidade

Para o teste de Fertilidade, foram utilizadas 30 éguas, sendo inseminados 15 com sêmen congelado de um único garanhão com tratamento DF5 e 15 com GL5.

As éguas, após a constatação do estro por rufiação, foram monitoradas por palpação retal e ultra-sonografia a cada 12 horas até a detecção de um folículo de diâmetro de 35mm, sendo posteriormente aplicado, por via endovenosa, 2500 U. I. de hCG, após 36 horas estas éguas foram monitoradas a cada 6 horas e sendo inseminadas no máximo 6 horas pós-ovulação.

Um esquema simplificado da metodologia aplicada ao Experimento I é mostrado na figura 1.

FIGURA 1 - Esquema simplificado da metodologia aplicada ao Experimento I.

3.6.2. Experimento II

3.6.2.1. Análise da motilidade espermática por microscopia óptica

A metodologia de análise da motilidade espermática por microscopia óptica utilizada no experimento II, foi à mesma realizada no Experimento I.

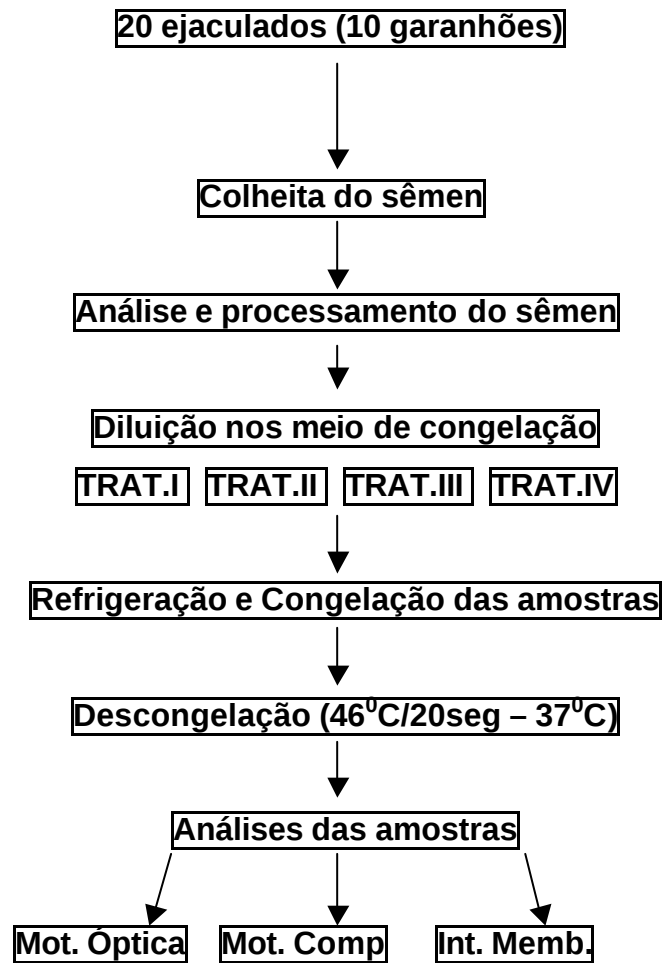
3.6.2.2. Análise computadorizada do movimento espermático

Também nesta análise obedeceu à mesma metodologia do Experimento I.

3.6.2.3. Análise de Integridade da membrana espermática através de sondas fluorescentes

Idem ao Experimento I.

A figura 2 mostra um esquema simplificado da metodologia aplicada ao Experimento II.

FIGURA 2 - Esquema simplificado da metodologia aplicada ao Experimento II.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias, foi utilizada a Análise de Variância para medidas repetidas, seguida do teste de Tukey para comparação múltiplas.

Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal e/ou homogeneidade de variâncias foi utilizado o teste de Friedman, seguido do teste de comparações múltiplas.

Para comparação de proporções foi utilizado o teste Exato de Fisher. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Para a comparação das proporções na análise ultra-estrutural foi utilizado o teste de Goodman.

Para comparações múltiplas entre proporções foi utilizado o teste de Tukey.

Para teste de correlações utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson.

5. RESULTADOS

5.1. Experimento I

Para variável de Motilidade Total (MTO), avaliada através de microscopia óptica os tratamentos DF5, MF5, DA3 (53,5; 50,0; 49,0, respectivamente) não diferenciaram estatisticamente entre si ($p < 0,05$) e foram superiores aos tratamentos DA5, DA1 e GL5 ($p > 0,05$) (47,2; 39; 27,2 respectivamente) o tratamento DA5 foi superior ao DA1 e GL5 e o tratamento DA1, superior ao GL5 ($p < 0,0001$). Em relação a Motilidade Progressiva (MPO), avaliado por microscopia óptica, os tratamentos MF5 e DF5 (16,5 e 14,8, respectivamente) não diferiram estatisticamente e foram superiores aos tratamentos DA3, DA1, DA5 e GL5 (14,5; 12,2; 12,2; 8,8 respectivamente, $p < 0,05$), o tratamento DA3, foi superior ao DA1, DA5 e GL5 ($p < 0,05$) e os tratamentos DA1 e DA5 superiores ao GL5 ($p < 0,0001$). Os resultados estão apresentados na Tabela 1 e Gráfico 1.

Quanto aos parâmetros Motilidade Total Computadorizada (MTH), os tratamentos DF5, DA3 e MF5 (52,4; 50,0; 49,4 respectivamente), apresentaram seus valores estatisticamente semelhantes ($p < 0,05$) e foram superiores aos tratamentos DA5, DA1 e GL5 (46,6; 38,2; 27,9 respectivamente), o tratamento DA5 foi superior aos tratamentos DA1 e GL5 e o DA1 superior ao GL5 ($p < 0,0001$). Nos valores de Motilidade Progressiva Computadorizada (MPH) os tratamentos MF5 e DA3 não se diferenciaram estatisticamente e foram superiores aos tratamentos DA1, DF5, DA5 e GL5, o tratamento DA1 foi superior ao DF5, DA5 e GL5, o DF5 superior ao DA5 e GL5 e o DA5 superior ao GL5 ($p < 0,0001$). (Tabela 1 e Gráfico 1).

Em relação à percentagem de espermatozóides íntegros, avaliados através de microscopia de fluorescência, os tratamentos DF5, MF5, DA5, DA3 e DA1 (51,4; 48,3; 47,6; 44,2; 44,6 respectivamente) não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$), mas foram superiores ao tratamento GL5 (32,4), ($p < 0,0001$). (Tabela 1 e Gráfico 1).

Para variável vigor não houve uma diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,1$), sendo obtido o valor de 2, na escala de 0 a 5 para todos os tratamentos. Quanto ao parâmetro de linearidade (LIN), o tratamento DA1 (44,0) foi superior aos demais tratamentos, entre os tratamentos, MF5, DF5 e GL5 (42,0; 39,0; 43,0 respectivamente) não se observou diferença estatística

($p < 0,05$), mas foram superiores aos tratamentos DA3 e DA5 (41,5; 39,5 respectivamente), sendo o tratamento DA3 superior ao tratamento DA5 ($p < 0,0001$). Em relação à percentagem de espermatozóides rápidos (RAP) os tratamentos DF5 e MF5 (33,0; 32,5 respectivamente) foram estatisticamente semelhantes e superiores aos tratamentos DA1, DA3, DA5 e GL5 (21,0; 30,0; 25,5; 14,0 respectivamente), sendo os tratamentos DA1, DA3 e DA5 semelhantes estatisticamente ($p < 0,05$) e superiores ao tratamento GL5 ($p < 0,0001$). (Tabela 2 e Gráfico 2).

Nas variáveis de VAP (velocidade do trajeto espermático) os tratamentos DF5 (88,5) e MF5 (85,6) foram estatisticamente superiores aos tratamentos DA3, DA1, GL5 e DA5 (83,9; 81,7; 78,5; 77,2 respectivamente), os tratamentos DA1 e DA3 superiores ao DA5 e GL ($p < 0,0001$). Em relação a VSL (velocidade retilínea) os tratamentos MF5 (65,7) e DF5 (62,8) foram superiores aos tratamentos DA1, DA3, GL5 e DA5 (63,5; 63,2; 60,2; 56 respectivamente) o DA1 (63,5) e DA3 (63,2) superior ao DA5 (56,0) e GL5 (60,2) $p < 0,0001$. Nos valores de VCL (velocidade real) o tratamento DF5 (166,3) foi estatisticamente superior aos tratamentos MF5, DA1, DA3, DA5 e GL5 (159,9; 150,2; 156,9; 145,7; 147,7 respectivamente) e o MF5 (159,9) superior aos tratamentos DA1, DA3, DA5 e GL5, $p < 0,0001$. (Tabela 3 e Gráfico 3).

Na análise ultraestrutural do acrossoma, por microscopia eletrônica de transmissão, em relação ao percentual de células apresentando integridade acrossomal, os resultados dos tratamentos DA5 (43,5) e MF5 (39,5), não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), porém superiores aos demais tratamentos (DA1, 25; DA3, 27; DF5, 26,5; GL5, 22,5, $p < 0,05$). (Quadro 1, Tabela 4 e Gráfico 4).

Na avaliação acrossomal por fluorescência (FITC – PNA e Iodeto de Propídio), os tratamentos DA5 (55,6), MF5 (60,64) e DF5 (56,18) não apresentaram diferença estatística entre si nos resultados de integridade acrossomal, mas foram superiores aos tratamentos DA1 (36,77), DA3 (34,68) e GL5 (34,47), $p < 0,05$. (Tabelas 5 e 6 e Gráfico – 5).

Quando se considerou a variável de membrana acrossomal externa ondulada e membrana ondulada na região apical, como parâmetros de integridade acrossomal, na avaliação por microscopia eletrônica de transmissão

(MET) segundo sugestão de Landim-Alvarenga (2002)*, o tratamento DA5 (55,5) mostrou-se superior aos demais (DA1, 43; DA3, 39; MF5, 52; DF5, 46; GL5 42), o tratamento MF5, foi superior ao DA1, DF5 e GL5 e os tratamentos DA1 e DF5 foram superiores ao GL5 ($p < 0,05$). (Tabela 7).

A correlação entre as técnicas da integridade acrossomal avaliadas por fluorescência (FITC – PNA e Iodeto de Propídio) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), com a inclusão dos parâmetros de MAEO (membrana acrossomal externa ondulada) e MORA (membrana acrossomal ondulada na região apical) no grupo considerando como apresentando Acrossomo integro, foi altamente, positiva e significativa ($r = 0,85$ e $p = 0,03$). (Tabela 8).

No teste de fertilidade o tratamento DF5, resultou em uma taxa de prenhez de 40% (6 gestações /15 inseminações), superando o tratamento GL5 onde as 15 inseminações resultaram em prenhes ($p < 0,017$). (Tabela 9 e Gráfico 7)

* Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, comunicação pessoal (2002)

TABELA 1 - Média e desvio padrão () referente as variáveis, Motilidade óptica total (MTO), Motilidade óptica progressiva (MPO), Motilidade computadorizada total (MTH), Motilidade computadorizada progressiva (MPH) e % de íntegros analisados por fluorescência (INT.) na comparação dos tratamentos DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5% (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%), pós-descongelação.

Tratamento	VARIÁVEL				
	MTO	MPO	MTH	MPH	INT.
DA1	39,0 (15,27) ^b	12,2 (4,72) ^{bc}	38,2 (15,40) ^b	12,8 (7,01) ^{ab}	44,6 (9,13) ^a
DA3	49,0 (11,07) ^a	14,5 (6,26) ^{ab}	50,0 (13,13) ^a	15,2 (7,82) ^a	44,2 (8,75) ^a
DA5	47,2 (16,89) ^{ab}	12,2 (6,97) ^{bc}	46,6 (13,34) ^{ab}	10,0 (7,70) ^{bc}	47,6 (6,88) ^a
MF5	50,0 (10,13) ^a	16,5 (5,87) ^a	49,4 (14,22) ^a	17,4 (7,20) ^a	48,3 (8,94) ^a
DF5	53,5 (11,82) ^a	14,8 (6,17) ^a	52,4 (12,80) ^a	12,6 (7,19) ^{abc}	51,4 (8,09) ^a
GL5	27,2 (15,52) ^c	8,8 (5,35) ^c	27,9 (17,37) ^c	8,8 (6,59) ^c	32,4 (10,23) ^b

Valor de $p < 0,0001$.

- Médias seguidas de mesma letra, dentro da mesma coluna, na comparação dos tratamentos para cada variável, não diferem estatisticamente.

GRÁFICO 1 – Médias referentes as variáveis, Motilidade óptica total (MTO), Motilidade óptica progressiva (MPO), Motilidade computadorizada total (MTH), Motilidade computadorizada progressiva (MPH) e % de íntegros analisados por fluorescência (INT.) na comparação dos tratamentos DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5% (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%), pós-descongelção.

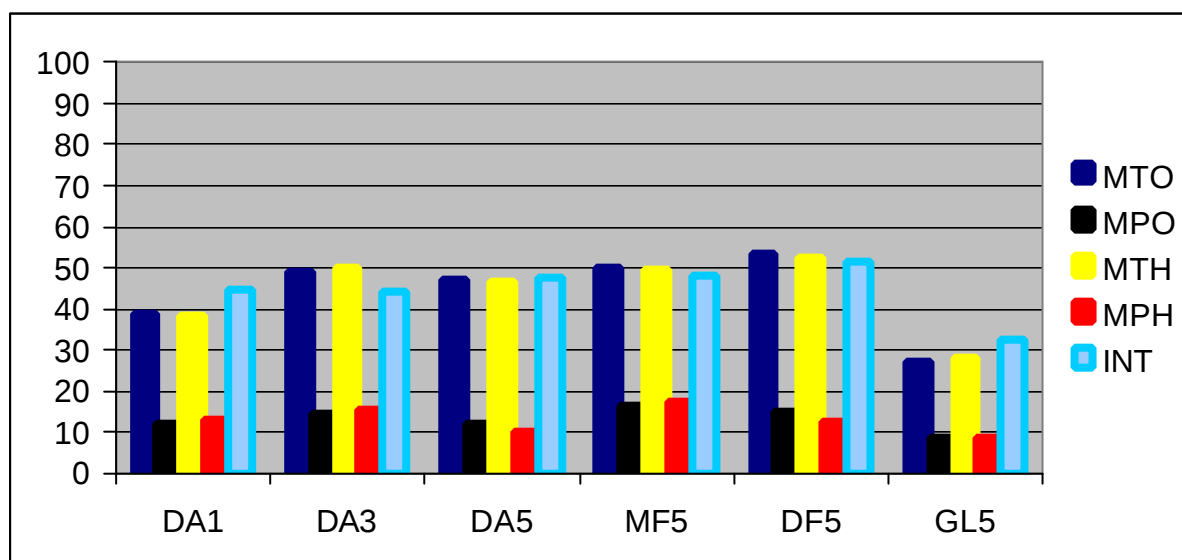


TABELA 2 - Mediana e 1^o e 3^o quartil [] referente as variáveis VIGOR (escala de 0 a 5), % de Linearidade (LIN), % de Rápidos (RAP), segundo os tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%) e GL5 (glicerol a 5%), pós-descongelção.

Tratamentos	VARIÁVEL		
	VIGOR	LIN	RAP
DA1	2,0 [2,0; 2,0] ^a	44,0 [41,5; 46,0] ^a	21,0 [11,5; 33,5] ^b
DA3	2,0 [2,0; 2,0] ^a	41,5 [39,0; 43,5] ^c	30,0 [11,5; 33,5] ^b
DA5	2,0 [2,0; 2,0] ^a	39,5 [36,0; 42,5] ^d	25,5 [10,5; 39,0] ^b
MF5	2,0 [2,0; 2,0] ^a	42,0 [41,0; 43,5] ^b	32,5 [25,5; 40,5] ^a
DF5	2,0 [2,0; 2,5] ^a	39,0 [37,0; 41,0] ^b	33,0 [27,0; 43,5] ^a
GL5	2,0 [2,0; 2,0] ^a	43,0 [41,0; 45,0] ^b	14,0 [8,5; 24,5] ^c
Valor de p	p>0,10	p<0,001	p<0,001

- Medianas, dentro da mesma coluna, representando os tratamentos, seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

GRÁFICO 2 – Medianas referentes as variáveis de VIGOR (escala de 0 a 5), % de Linearidade (LIN), % de Rápidos (RAP), segundo os tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%) e GL5 (glicerol a 5%), pós-descongelamento.

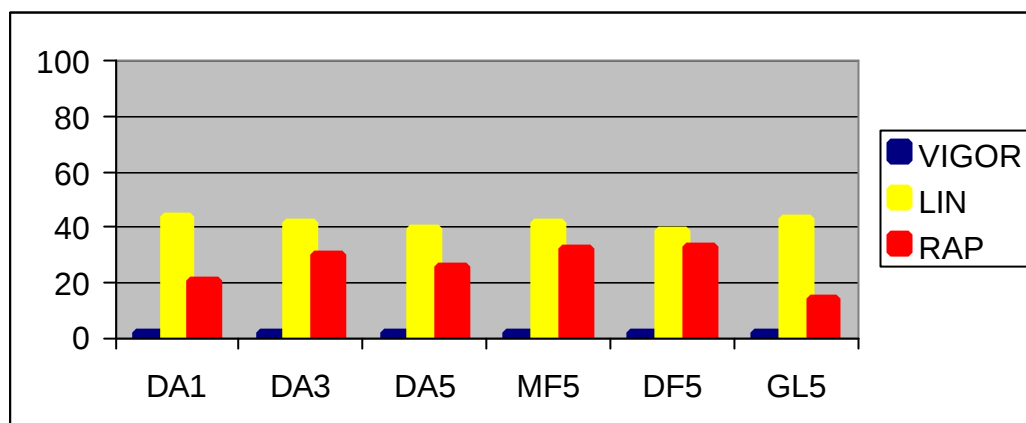


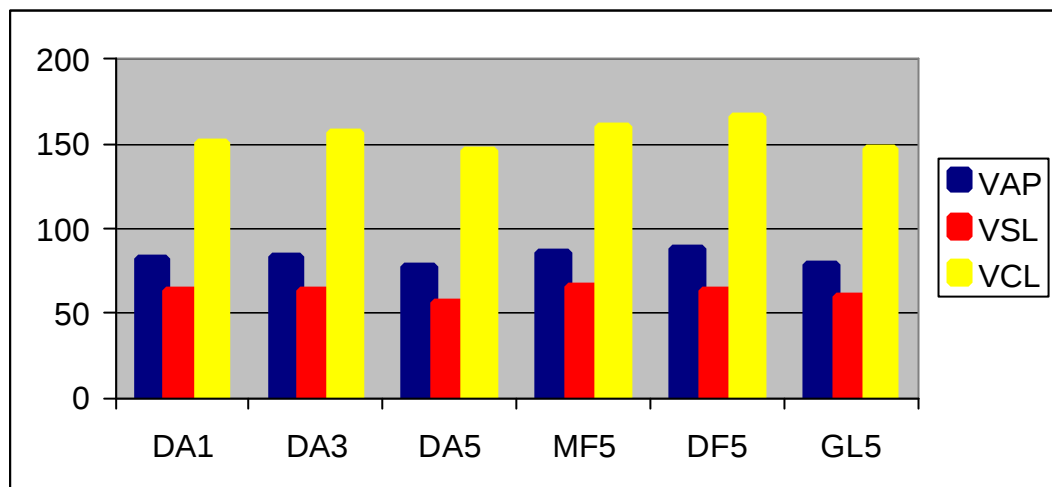
TABELA 3 - Média e desvio padrão () referentes as variáveis, VAP, VSL e VCL, na comparação dos tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%), pós-descongelção.

Tratamentos	VARIÁVEL		
	VAP	VSL	VCL
DA1	81,7 (10,41) ^{ab}	63,5 (7,16) ^{ab}	150,2 (20,88) ^b
DA3	83,9 (9,69) ^{ab}	63,2 (7,79) ^{ab}	156,9 (16,58) ^b
DA5	77,2 (16,29) ^b	56,0 (12,27) ^b	145,7 (28,80) ^b
MF5	85,6 (8,79) ^a	65,7 (6,63) ^a	159,9 (16,27) ^{ab}
DF5	88,5 (10,33) ^a	62,8 (7,71) ^a	166,3 (18,52) ^a
GL5	78,5 (10,06) ^b	60,2 (7,54) ^b	147,7 (19,21) ^b

Valor de $p < 0,0001$

- Médias, dentro da mesma coluna, seguidas de mesma letra na comparação dos tratamentos para cada variável não diferem estatisticamente.

GRÁFICO 3 - Médias referentes as variáveis, VAP, VSL e VCL, na comparação dos tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%), pós-descongelamento.



QUADRO 1 - Percentagem de alterações acrossomais avaliadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.

	DA1	DA3	DA5	MF5	DF5	GL5
Acros. Int.*	25	27	43,5	39,5	26,5	22,5
M.A.E.O	17,5	12	12	11,5	14,5	13,5
M.O.R.A	0,5	0	0	1	5	6
M.A.E.D	28	23	14	18,5	17	17,5
M.A.E.D.R.A.	1	2,5	1,5	0,5	3	1
M.A.E.R.	1	5	3	1,5	6,5	4
Acros. Vesic.	7,5	8	10,5	7,5	6	7
Aus. Acros.	10	16,5	11,5	5	8,5	12
Acros. Dest.	9,5	8	7,5	10	11	16,5

* Acros. Int: Acrossoma intacto.

M.A.E.O: Membrana acrossomal externa ondulada.

M.O.R.A: Membrana ondulada na região apical.

M.A.E.D: Membrana acrossomal externa destacada.

M.A.E.D.R.A: Membrana acrossomal externa destacada na região apical.

M.A.E.R: Membrana acrossomal externa rompida.

Acros. Vesic: Acrossoma vesiculado.

Aus. Acros: Ausência de acrossoma.

Acros. Dest: Acrossoma destacado.

TABELA 4 - Comparações das percentagens, referente à integridade acrossomal e acrossomos lesados através de análise ultraestrutural (Microscopia Eletrônica de Transmissão), segundo os tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%), pós-descongelação.

Tratamentos	VARIÁVEL	
	Acrossoma integro	Acrossoma Lesado
DA1	25,0 ^b	75,0
DA3	27,0 ^b	73,0
DA5	43,4 ^a	56,5
MF5	39,5 ^a	60,5
DF5	26,5 ^b	73,5
GL5	22,5 ^b	77,5

Valor de $p < 0,05$

- Médias, dentro de mesma coluna, seguidas de mesma letra na comparação dos tratamentos para cada variável, não diferem estatisticamente.

GRÁFICO 4 - Comparações das percentagens, referente à integridade acrossomal e acrossoma lesados através de análise ultraestrutural (Microscopia Eletrônica de Transmissão), segundo os tratamentos; DA1 (dimetilacetamida a 1%), DA3 (dimetilacetamida a 3%), DA5 (dimetilacetamida a 5%), MF5 (metilformamida a 5%), DF5 (dimetilformamida a 5%), GL5 (glicerol a 5%), pós-descongelação.

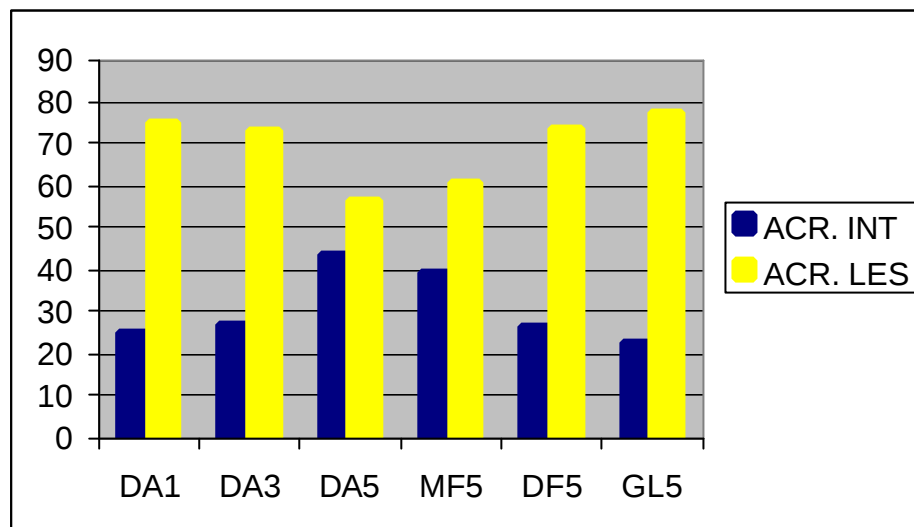


TABELA 5 – Percentagem das alterações acrossomais avaliadas por fluorescência (FITC- PNA e Iodeto de Propídio), segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5, pós-descongelção.

	DA1	DA3	DA5	MF5	DF5	GL5
V.N.R. (Íntegros)	36,77 ^a	34,68 ^a	55,6 ^b	60,64 ^b	56,18 ^b	34,47 ^a
V.R. (Lesados)	0,24	0	0	0,74	0	0
M.N.R. (Lesados)	61,22	64,85	37,57	33,55	31,31	60,02
M.R. (Lesados)	1,74	0,5	6,66	5,06	12,5	4,5

* V.N.R.- Vivos não reagidos.

V.R.- Vivos reagidos.

M.N.R.- Mortos não reagidos

M.R.- Mortos reagidos.

TABELA 6 - Integridade acrossomal das amostras, segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5, avaliados através de sondas fluorescentes (FITC – PNA e Iodeto de propídio), pós-descongelção.

	DA1	DA3	DA5	MF5	DF5	GL5
Íntegros	36,77 ^a	34,68 ^a	55,6 ^b	60,64 ^b	56,18 ^b	34,47 ^a
Lesados	63,23	65,32	44,4	39,36	43,82	65,53

Valor de $p < 0,05$.

- Média seguida de mesma letra, na mesma linha, na comparação dos tratamentos para cada variável não diferem estatisticamente.

GRÁFICO 5 - Integridade acrossomal das amostras, segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5, avaliados através de sondas fluorescentes (FITC – PNA e Iodeto de propídio), pós-descongelamento.

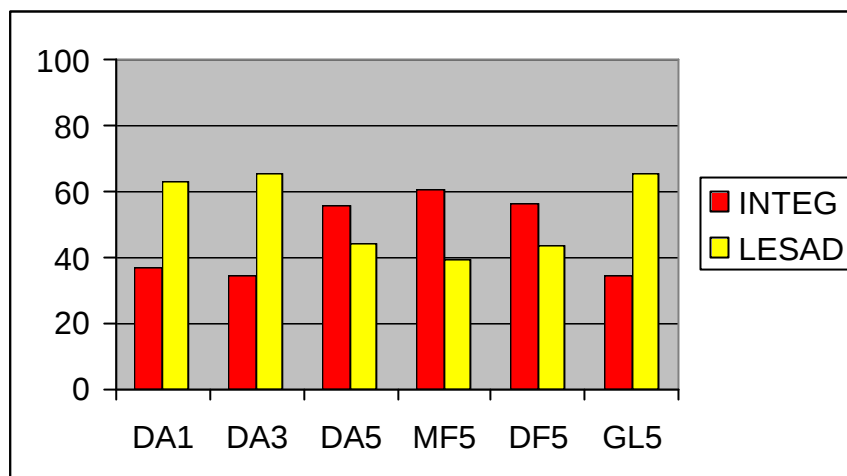


TABELA 7 - Integridade acrossomal das amostras através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) incluindo como normais as ondulações da membrana acrossomal, segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5, pós-descongelamento.

	DA1	DA3	DA5	MF5	DF5	GL5
Integros	43 ^{abc}	39 ^c	55,5 ^a	52 ^{ab}	46 ^{abc}	42 ^{bc}
Lesados	57	61	45,5	48	54	58

Valor de $p < 0,05$.

- Médias seguidas de mesma letra, dentro da mesma linha, na comparação dos tratamentos para cada variável não diferem estatisticamente

GRÁFICO 6 - Integridade acrossomal das amostras através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) incluindo as ondulações da membrana acrossomal (MAE e MORA), segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5, pós-descongelamento.

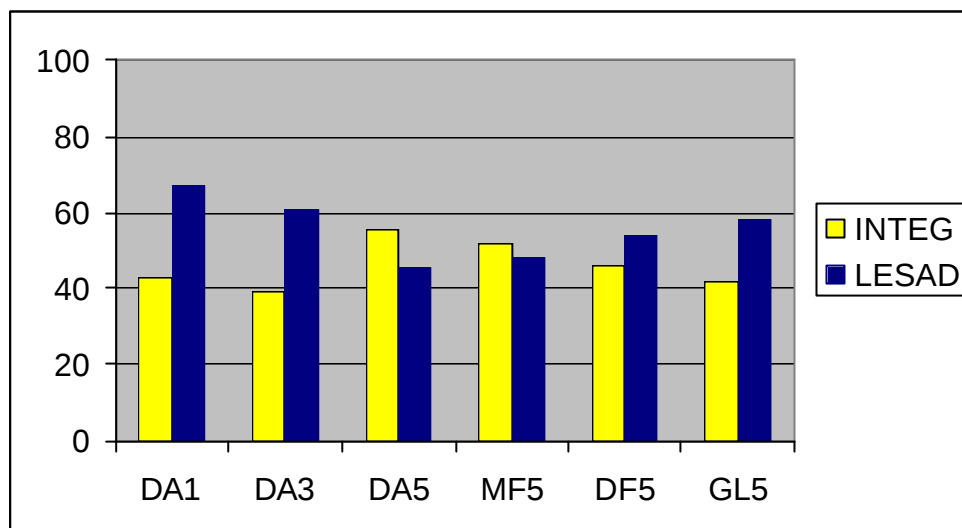


TABELA 8 – Correlação dos resultados de integridade acrossomal entre as técnicas de avaliação; Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e fluorescência (FITC – PNA e Iodeto de Propídio).

Tratamentos	Int. Acros. M.E.T	Int. Acros. FITC-PNA
DA1	43	36,77
DA3	39	34,68
DA5	55,5	55,6
MF5	52	60,64
DF5	46	56,18
GL5	42	34,47

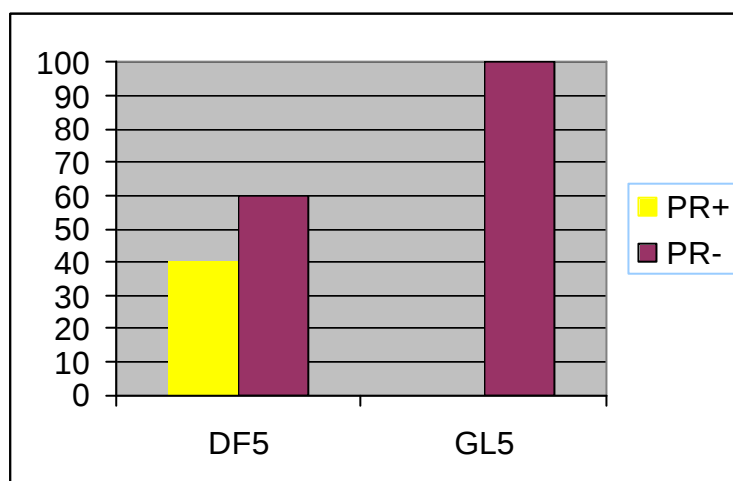
- $r=0,85$.
- $p=0,03$

TABELA 9 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas do teste de fertilidade segundo o tipo do crioprotetor utilizado no sêmen congelado.

Tratamento	PRENHES	
	Positivo n /(%)	Negativo n/ (%)
DF5	6 /(40%)	9/(60%)
GL5	0	15/ (100%)

Valor de $p < 0,017$.

GRÁFICO 7 - Distribuição de freqüências absolutas e relativas do teste de fertilidade segundo o tipo do crioprotetor utilizado no sêmen congelado; PR+(prenhez positiva), PR-(prenhez negativa).



5.2. Experimento II

No parâmetro de Motilidade Total Óptica (MTO) o tratamento III (DF5%) apresentou Motilidade Total superior aos demais tratamentos (T.III, 60% em relação aos TI, 48,5%; TII, 56,8% e TIV, 34,2%). O tratamento II (3,5% DF + 1,5% GL) mostrou-se superior aos tratamentos I e IV e o tratamento I (1,5%DF + 3,5% GL) apresentou um percentual Motilidade Total Óptica, superior em comparação ao tratamento IV (GL5%) ($p < 0,0001$). Na variável Motilidade Progressiva Óptica (MPO) os tratamentos II e III (19,1 e 20,8 respectivamente) apresentaram valores superiores aos tratamentos I e IV (18,2 e 14,1 respectivamente) e o tratamento I (18,2) mostrou-se superior ao tratamento IV (14,1) ($p < 0,016$).

Os resultados de Motilidade Total Computadorizada (MTH), segundo os tratamentos: I (48,4%), II (57%), III (59,6%) e IV (38,4%) apresentaram a mesma tendência estatística nos parâmetros de Motilidade Total Óptica ($p < 0,0001$) e os valores de Motilidade Progressiva Computadorizada (T.I, 19,4; TII, 19,0; TIII, 18,2 e T.IV, 16,4), não apresentaram diferença significativa ($p > 0,55$).

Na avaliação de integridade de membrana foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. O tratamento III (49,6%) apresentou um percentual de integridade de membrana mais alto em comparação aos demais tratamentos (37,8, 44,0, 28,2% para os tratamentos I, II e IV respectivamente). O tratamento II (44,0%) apresentou um percentual de integridade de membrana superior em relação aos tratamentos I (37,8%) e IV (28,2%), e o tratamento I foi superior ao tratamento IV ($p < 0,0001$). (Tabela- 10 e Gráfico - 8).

Na variável Vigor (escala de 0 a 5) os tratamentos I (2), II (2,5) e III (3) foram superiores estatisticamente ao tratamento IV (2) ($p < 0,0001$). Na variável linearidade(LIN) avaliada pelo HTM – IVOS –10, os tratamentos I (45,5) e IV (47,0) foram superiores ($p < 0,0001$) aos tratamentos II (42,0%) e III (39,5%), na percentagem de espermatozóides rápidos (RAP) os tratamentos II (38,5) e III (46,0) apresentaram-se estatisticamente superiores ($p < 0,0001$) aos tratamentos I (33,5) e IV (26,5). (Tabela - 11 e Gráfico - 9).

Nos resultados referentes aos padrões de velocidade espermática analisada pelo HTM – IVOS – 10, os valores de VAP (velocidade do trajeto espermático), segundo os tratamentos: I, 90,1; II, 94,8; III, 92,3; IV, 87,6 não diferiram estatisticamente ($p > 0,11$). Quanto a VSL (velocidade retilínea) também

não se observou diferença estatística ($p>0,98$) entre os tratamentos I, II, III, IV (70,1, 69,6, 69,4, 69,5 respectivamente). Nos valores de VCL (velocidade real) os tratamentos II (69,6) e III (69,4), foram estatisticamente superiores ($p<0,0002$) aos tratamentos I (161,0) e IV (156,3). (Tabela - 12 e Gráfico - 10).

TABELA 10 - Média e desvio padrão () referentes as variáveis, Motilidade total óptica (MTO), Motilidade progressiva óptica (MPO), Motilidade computadorizada total (MTH), Motilidade progressiva computadorizada (MPH), % de íntegros analisados por fluorescência (INT.), segundo os tratamentos: I (1,5% de DF +3,5% de GL), II (3,5% de DF + 1,5% de GL), III (5% de DF), IV (5% de GL), pós-descongelação.

Tratamento	VARIÁVEL				
	MTO	MPO	MTH	MPH	INT.
I	48,5 (14,70) ^b	18,2(7,99) ^{ab}	48,4 (15,37) ^b	19,4(10,09) ^a	37,8(8,71) ^c
II	56,8(11,84) ^{ab}	19,1 (7,77) ^a	57,0(12,31) ^{ab}	19,0(7,82) ^a	44,0(5,35) ^b
III	60,0(11,47) ^a	20,8 (8,23) ^a	59,6 (10,89) ^a	18,2(8,31) ^a	49,6(6,64) ^a
IV	34,2 (15,50) ^c	14,1 (9,16) ^b	38,9 (18,74) ^c	16,4(11,49) ^a	28,2(9,88) ^d
	$p<0,0001$	$p< 0,016$	$p<0,0001$	$p>0,55$	$p<0,0001$

- Médias, dentro de mesma coluna, seguidas de mesma letra na comparação dos tratamentos, para cada variável, não diferem estatisticamente.

GRÁFICO 8 – Médias referentes as variáveis, Motilidade total óptica (MTO), Motilidade progressiva óptica (MPO), Motilidade computadorizada total (MTH), Motilidade progressiva computadorizada (MPH), % de íntegros analisados por fluorescência (INT.), segundo os tratamentos: I (1,5% de DF +3,5% de GL), II (3,5% de DF + 1,5% de GL), III (5% de DF), IV (5% de GL), pós-descongelação.

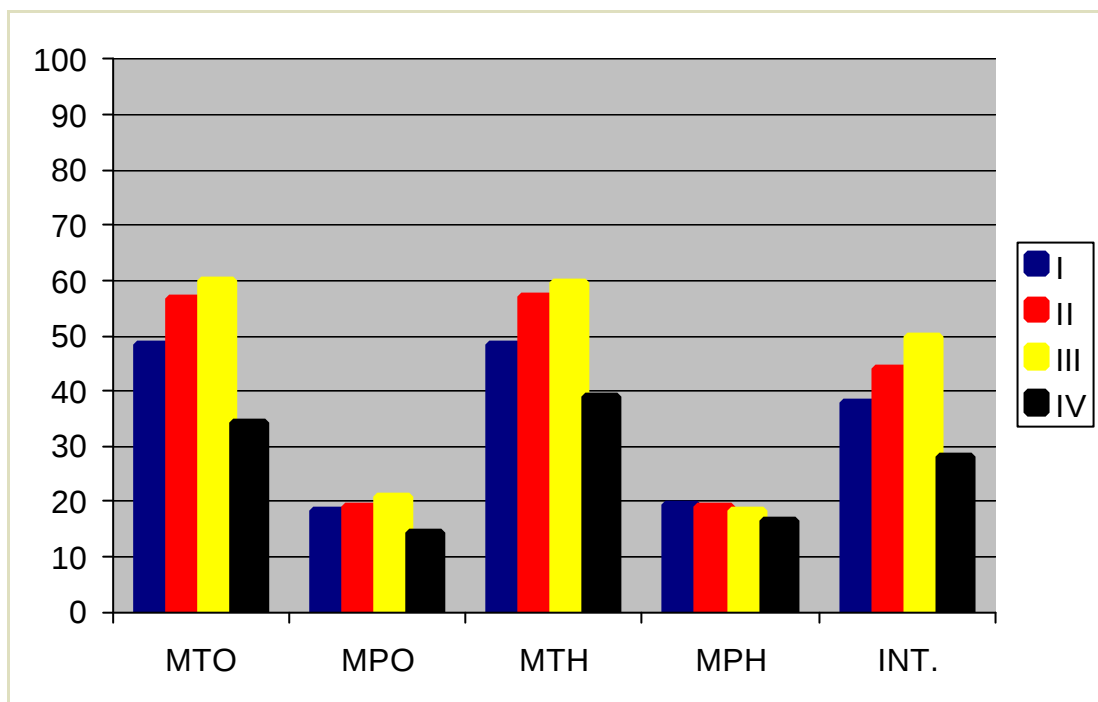


TABELA 11 - Mediana, 1^o e 3^o Quartil [] referente as variáveis, Vigor (escala de 0 a 5), Linearidade (%) e % de Rápidos, segundo os tratamentos: I (1,5% de DF+ 3,5% de GL), II (3,5% de DF+ 1,5% de GL), III (5% de DF) e IV (5% de GL), pós-descongelação.

Tratamento	Variável		
	VIGOR	LIN.	% DE RAP.
I	2,0 [2,0; 3,0] ^a	45,5 [43,5; 48,5] ^a	33,5 [22,5; 45,0] ^b
II	2,5 [2,0; 3,0] ^a	42,0 [39,0; 44,0] ^b	38,5 [33,5; 53,0] ^a
III	3,0 [2,0; 3,0] ^a	39,5 [38,0; 42,0] ^b	46,0 [35,5; 52,0] ^a
IV	2,0 [1,5; 3,0] ^b	47,0 [44,5; 49,0] ^a	26,5 [9,5; 45,5] ^b
	p< 0,001.	p<0,0001	p<0,0001

- Medianas, dentro de mesma coluna, representando os tratamentos, seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

GRÁFICO 9 - Medianas referentes as variáveis, Vigor (escala de 0 a 5), Linearidade (%) e % de Rápidos, segundo os tratamentos: I (1,5% de DF+ 3,5% de GL), II (3,5% de DF+ 1,5% de GL), III (5% de DF) e IV (5% de GL).

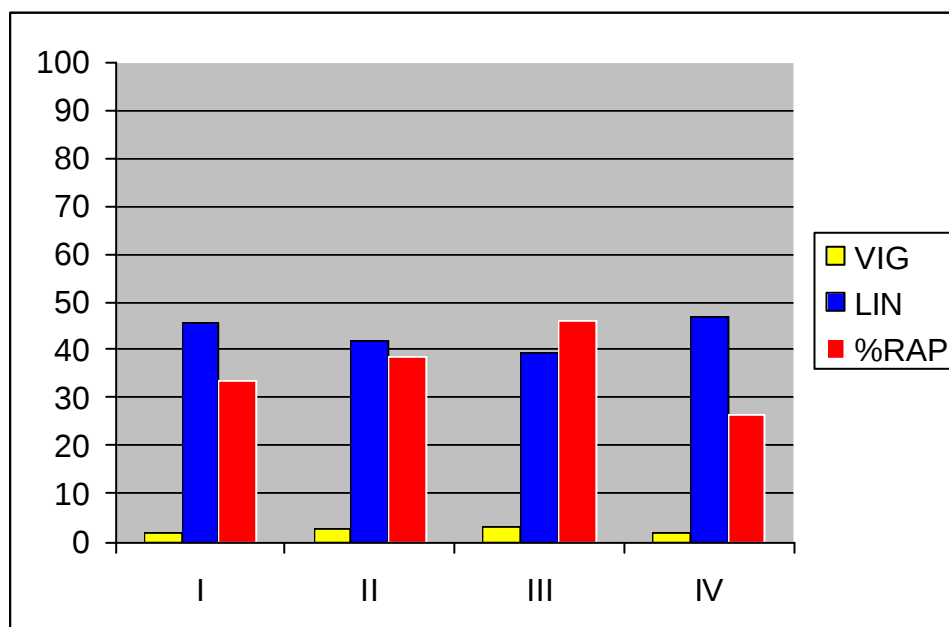
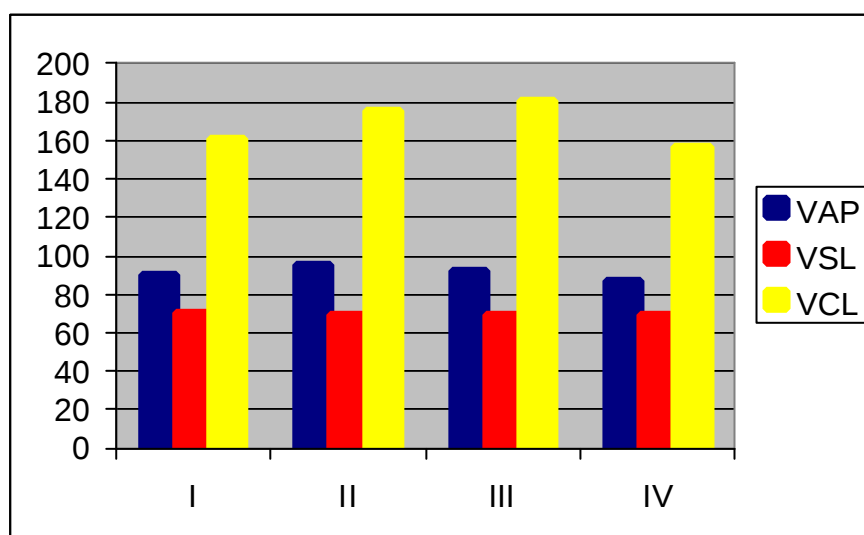


TABELA 12 - Média e desvio padrão () referente as variáveis, VAP, VSL, VCL, na comparação dos tratamentos; I (1,5% de DF+ 3,5% de GL), II (3,5% de DF+ 1,5% de GL), III (5% de DF), IV (5% de GL).

Tratamento	Variável		
	VAP	VSL	VCL
I	90,1 (16,39) ^a	70,1 (12,56) ^a	161,0 (27,83) ^b
II	94,8 (15,94) ^a	69,6 (10,91) ^a	175,5 (28,65) ^a
III	92,3 (23,14) ^a	69,4 (9,95) ^a	180,7 (26,05) ^a
IV	87,6 (17,30) ^a	69,5 (13,38) ^a	156,3 (31,55) ^b
	p> 0,11	p>0,98	p< 0,0002

- Médias, dentro de mesma coluna, seguidas de mesma letra na comparação dos tratamentos para cada variável não diferem estatisticamente.

GRÁFICO 10 - Médias referentes as variáveis, VAP, VSL, VCL, na comparação dos tratamentos; I (1,5% de DF+ 3,5% de GL), II (3,5% de DF+ 1,5% de GL), III (5% de DF), IV (5% de GL).



6. DISCUSSÃO

O Experimento I evidenciou uma grande variação dos resultados obtidos, nos diferentes parâmetros avaliados, entre os crioprotetores, ganhões utilizados e mesmo entre os ejaculados dos diferentes indivíduos.(Vide Anexo 7 a 12). Contudo uma maior população de indivíduos apresentaram sêmen com boas características pós-descongelção com o uso de crioprotetores a base de amidas.

Trabalhos anteriormente publicados por diversos autores em diferentes espécies animais, onde se utilizou crioprotetores a base de amidas em comparação ao glicerol evidenciaram uma superioridade dos agentes crioprotetores a base de amidas.(Hanada e Nagase, 1980; Lake e Ravie, 1984; Tselutin et al., 1995, Chalah et al.,1999; Tselutin et al.,1999; Ogier de baulny et al., 1999).

Os resultados dos parâmetros de motilidade total computadorizada e viabilidade celular por fluorescência obtido no tratamento DF5 (dimetilformamida a 5%) não coincidiram com os resultados obtidos nos trabalhos de Keith (1998), Graham (2000), Alvarenga et. al., (2000) e Vidament et al., (2002), no qual o glicerol a 5% foi superior a dimetilformamida ou não foi constada diferença estatística entre eles.

No tratamento MF5 (metilformamida a 5%), os parâmetros de motilidade total computadorizada e integridade celular foram superiores aos do tratamento GL5 (glicerol a 5%), sendo similares aos resultados obtidos por Gomes et. al., (2002), onde estes constatarem diferença significativa nos resultados de motilidade total computadorizada e integridade celular favoráveis a metilformamida a 5% (v/v) em comparação ao glicerol na mesma concentração. Porém, discordantes com os resultados publicados por Keith (1998) e Graham (2000), quando estes, utilizaram a mesma concentração de metilformamida e glicerol (0,6M), não observando diferenças entre os dois crioprotetores. Entretanto, quando estes utilizaram uma concentração de metilformamida de 0,9M, constatarem uma melhoria significativa, nos parâmetros de motilidade total, progressiva e viabilidade celular em comparação aos outros crioprotetores estudados.

Em estudo anterior desenvolvido por Hanada e Nagase (1980), na criopreservação de espermatozoides de coelhos, também foi observado uma superioridade da dimetilformamida na concentração de 0,5M em relação a motilidade ($p < 0,01$), comparado ao glicerol na mesma concentração (2 e 8% respectivamente) e também a outros crioprotetores testados. Kazuko et al., (1997) utilizando a dimetilformamida a 10% e o DMSO na mesma concentração, como crioprotetores para congelamento de espermatozoides do peixe Medaka (*Oryzias latipes*), concluíram que a dimetilformamida foi mais eficiente em relação ao DMSO nos parâmetros de motilidade e fertilidade pós-descongelamento.

A dimetilacetamida é um crioprotetor largamente utilizado nos protocolos de criopreservação de espermatozoides de peixes (Ogier de Baulny et al., 1997; Ogier de Baulny et al., 1999; Cabrita et al., 1998) e de aves (Lake e Ravie, 1984; Tselutin et al., 1995; Tselutin et al., 1999), trazendo grandes benefícios a estas espécies na resposta pós-descongelamento dos espermatozoides.

Ogier de Baulny et al., (1999), utilizando os crioprotetores DMSO, dimetilacetamida, glicerol, metanol e propilenoglicol nas concentrações de 5, 10 e 15% na criopreservação de espermatozoides de peixes (*Silurus glanis*), obtiveram uma melhoria pós - descongelamento ($p < 0,05$) na motilidade computadorizada com a utilização da dimetilacetamida nas concentrações de 10 e 15% e altas taxas de espermatozoides viáveis e com atividade mitocondrial avaliados pelas sondas fluorescentes Iodeto de Propídio e Rhodamina 123 em relação ao glicerol e outros crioprotetores. Entretanto em trabalho anterior utilizando os espermatozoides da truta Arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), Ogier de Baulny et al., (1997) notaram que o DMSO a 10% foi mais eficiente em relação a dimetilacetamida nas concentrações de 5, 10 e 15% na manutenção da integridade da membrana espermática pós – descongelamento (45, 30, 25 e 23% respectivamente; $p < 0,05$).

Chalah et al., (1999) observaram uma superioridade do glicerol em relação ao percentual de espermatozoides viáveis ($p < 0,05$), quando comparado a dimetilformamida e a dimetilacetamida nos períodos de 0, 4 e 24 horas pós-descongelamento, avaliados pelas colorações Eosina e Nigrosina e pelas sondas fluorescentes SYBR-14 e PI (iodeto de propídio). Quando estes avaliaram quanto à taxa de fertilidade, amostras criopreservadas com a dimetilacetamida foram comparáveis a resultados de inseminações com sêmen a fresco (88 e 93% respectivamente; $p > 0,05$) e superior a dimetilformamida e ao glicerol (79 e 76%

respectivamente; $p < 0,05$). No trabalho realizado por Tselutin et. al., (1999), onde se comparou crioprotetores e métodos de envase (*pellets* e palhetas), estes observaram que o glicerol produziu uma menor alteração morfológica nos espermatozóides de galos em relação ao DMSO e a dimetilacetamida, diluídos em meios de congelação com diferentes concentrações de crioprotetores. Após a congelação e descongelação de amostras congeladas na forma de *pellets* com a dimetilacetamida, foram superiores quanto a fertilidade em relação as amostras de sêmen congeladas com o glicerol (63,9 a 53,7 e 92,7 a 84,7% respectivamente; $p < 0,05$).

Não existem relatos na literatura científica da utilização da dimetilacetamida como agente crioprotetor para espermatozóides de garanhões.

Em protocolos de criopreservação de espermatozóides de peixes a concentração da dimetilacetamida varia de 10 a 15% (Ogier de Baulny et al., 1999).

No presente experimento a dimetilacetamida, nas concentrações de 1%(v/v), 3% (v/v) e 5%(v/v) superou o glicerol nas avaliações de motilidade óptica, computadorizada, integridade celular e integridade acrossomal avaliados por microscopia eletrônica de transmissão e fluorescência. Concentrações acima de 5% de dimetilacetamida foram tóxicas aos espermatozóides de garanhões, segundo testes realizados preliminarmente (dados não publicados).

Na avaliação acrossomal por Microscopia Eletrônica de Transmissão foi utilizado *pools* entre os ejaculados dos diferentes garanhões, desconsiderando a variável garanhão e ejaculado. Os resultados de integridade acrossomal dos tratamentos DA5 e MF5 (43,5 e 39,5% respectivamente) foram superiores ($p < 0,05$) aos tratamentos DA1, DA3, DF5 e GL (25, 27, 26,5 e 22,5% respectivamente).

Os resultados dos tratamentos DA1, DA3, DF5 E GL5 são proporcionais aos obtidos por Christensen et al., (1995), no qual avaliaram as alterações encontradas no sêmen eqüino a fresco e pós-descongelação, encontrando um percentual de 24% de alterações acrossomais, como o destacamento da membrana acrossomal externa e redução da densidade acrossomal nas amostras pós- descongelação.

Alvarenga et al., (2000) utilizando como agentes crioprotetores na congelação de sêmen de garanhões o etilenoglicol nas concentrações de 5%, 10%, o glicerol na concentração de 5% e associação do etilenoglicol e glicerol (3

e 2% respectivamente) obtiveram percentuais de integridade acrossomal, avaliados por microscopia eletrônica de transmissão, na ordem de 28, 22,5, 25,5 e 22,5% respectivamente. Em um segundo experimento onde se avaliou a eficiência crioprotetora do etilenoglicol e do glicerol na concentração de 5% na congelação de sêmen em palhetas e macrotubos alemães observou-se percentuais de integridade acrossomais avaliados por microscopia eletrônica de 28, 25,5 para os tratamentos glicerol e etilenoglicol a 5% envazados em palheta francesa e 16% para o etilenoglicol e o glicerol a 5% envazados em macrotubo alemão.

Landim-Alvarenga et al., (2001), obtiveram percentuais de integridade acrossomal de espermatozóides eqüinos congelados, avaliados por microscopia eletrônica de transmissão, com glicerol a 0,55M e DMSO a 1M e torno de 25% e 23% respectivamente.

Na avaliação acrossomal pela fluorescência a manutenção da integridade acrossomal dos tratamentos DA5, MF5 e DF5, foi significativamente superior aos tratamentos DA1, DA3 e GL5 ($p < 0,05$). Arruda (2000) em um estudo onde comparou os meios diluentes EDTA-lactose-gema de ovo (Martin et al., 1979), INRA 82 (Palmer, 1984) e o meio diluente a base de Leite desnatado (Burns e Fleming, 1988), acrescidos dos crioprotetores etilenoglicol a 5% e glicerol a 5%, encontrou valores para espermatozóides eqüinos viáveis com acrossomas intactos pós-descongelação, avaliados através das sondas fluorescentes FITC-PSA e H33258 por citometria de fluxo de 24, 21,9, 25,8, 25,8, 18, 20,9, para o meio de EDTA-lactose-gema de ovo com 5% de glicerol, EDTA-lactose-gema de ovo com 5% de etilenoglicol, INRA 82 com glicerol a 5%, INRA 82 com etilenoglicol a 5%, Leite desnatado com glicerol a 5% e Leite desnatado com etilenoglicol a 5% respectivamente ($p > 0,05$). Estes resultados foram inferiores aos obtidos neste experimento e podendo estas diferenças estar relacionadas à utilização dos crioprotetores a base de amidas.

A correlação das técnicas de fluorescência e microscopia eletrônica de transmissão quando se considerou as alterações acrossomais mais leves como normais (ondulações da membrana acrossomal externa e ondulação da membrana acrossomal externa na região apical encontradas na microscopia eletrônica), foi $p = 0,03$ e $r = 0,85$. Onde constatamos uma superioridade dos tratamentos DA5, MF5 e DF5 em relação aos tratamentos DA1, DA3 e GL5, em manter a integridade acrossomal dos espermatozóides pós - descongelação.

As diferenças nos resultados encontrados com crioprotetores à base de amidas, em relação ao glicerol neste experimento provavelmente estejam relacionadas à resistência individual, a congelação e descongelação dos espermatozóides dos garanhões utilizados.

Os garanhões GOR*, G11*, G12* e G15*, apresentaram resultados referentes a motilidade total computadorizada inferiores a 30% quando foi utilizado o glicerol a 5%, sendo, no entanto superiores quando as amidas foram utilizadas, com uma grande variabilidade entre elas, evidenciando uma variação na resposta pós –descongelação dos garanhões frente aos crioprotetores utilizados (vide anexo – 7).

A diferença dos resultados obtidos, quanto aos crioprotetores, neste experimento, nos parâmetros de motilidade e integridade de membrana foi semelhante aos encontrados no trabalho de Gomes et al., (2002), onde se utilizaram garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais em sua maioria apresentavam uma baixa congelabilidade com a utilização do glicerol como crioprotetor.

A superioridade dos crioprotetores à base de amidas pode estar supostamente relacionada, ao seu mecanismo de ação e seu baixo peso molecular, o qual por ser menor que o glicerol possa vir a causar um menor estresse osmótico as células espermáticas.

No teste de fertilidade foi utilizado o sêmen do garanhão GOR, o qual apresentava uma motilidade total média, pós - descongelação em torno de 50% do sêmen congelado com dimetilformamida (DF5%) e 20% para o sêmen congelado com glicerol a 5%. A escolha deste garanhão objetivou avaliar a eficiência da dimetilformamida em manter as capacidades fertilizantes dos espermatozóides pós-descongelação em relação ao glicerol em um garanhão com baixa congelabilidade quando do uso do glicerol.

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado na criopreservação de espermatozóides, apesar do seu efeito contraceptivo relatado em trabalhos em diferentes espécies (Pace e Sullivan, 1975; Sexton, 1975; Phillips et al., 1996; Guay et al., 1981; Hay et al., 1997; Jeyendran et al., 1985).

O presente estudo demonstrou que o glicerol a 5% exerceu um efeito contraceptivo no sêmen congelado do garanhão utilizado para as inseminações, pelo resultado evidenciado, onde a melhoria da motilidade pós-descongelação da dimetilformamida refletiu-se em melhoria de fertilidade.

Os resultados desta avaliação também constataram haver uma variação individual de ganhões, quanto à fertilidade do sêmen congelado frente à utilização de diferentes crioprotetores.

Uma das hipóteses dos resultados alcançados no presente trabalho, está relacionado ao mecanismo no qual as amidas desempenham na criopreservação dos espermatozoides e também ao seu peso molecular, mais baixo em relação ao glicerol, conferindo-as uma maior permeabilidade as membranas dos espermatozoides, conseqüentemente trazendo um menor dano osmótico às células espermáticas. Ball et al., (2002) observaram que os espermatozoides de ganhões são altamente sensíveis aos danos osmóticos causados pelo glicerol.

As amidas possuem um mecanismo de ação crioprotetor diferente do glicerol, devido sua estrutura molecular e sua habilidade de permear a membrana celular.

As amidas caracterizam-se quimicamente pela existência em sua estrutura, de uma molécula de nitrogênio ligado a um grupo carboxila. Seus grupos funcionais, os quais realizam ligações de hidrogênio com a molécula da água, são o grupo amina (contendo nitrogênio) e um grupo de ácido carboxílico (contendo oxigênio), conferindo - as uma capacidade de aceitar um hidrogênio da molécula da água em três sítios diferentes (Ashwood-Smith, 1987).

O glicerol, classificado quimicamente como álcool pelos seus grupos hidroxilas, tem a capacidade de realizar ligações de hidrogênio com a molécula da água em seis sítios, possuindo o dobro da capacidade de coligação com a molécula da água em comparação com as amidas (Nash, 1996; Ashwood-Smith, 1987). No entanto os álcoois, os quais possuem grupos hidroxilas, tem a capacidade de além de formar coligações com a molécula da água, a de ligar-se com outros componentes do meio diluente o qual contenha grupos hidroxilas, ou seja podendo o glicerol realizar ligações entre si e também conferem aos álcoois uma alta viscosidade (Karow, 2001), o qual dificulta sua difusão nas membranas plasmáticas, podendo acarretar danos osmóticos aos espermatozoides (Ball e Vo, 2001). Wowk et al. (1999), notaram que a substituição dos grupos hidroxilas por grupos carboxil ($-OCH_3$), em poliois como o glicerol, conferiram a estes uma menor viscosidade, uma melhor atividade coligativa, porém a substância derivada, no caso do glicerol apresentou uma alta toxicidade celular.

Keith (1998), observou que a adição de um grupo *metil*, nas moléculas de formamida e acetamida, conferiu uma melhor atividade crioprotetora a estas

moléculas para os espermatozóides, porém a adição de mais um grupo *metil* não trouxe benefícios adicionais.

Portanto supõe-se que as amidas possuam uma forma mais eficaz de realizar a coligação com a molécula da água e desempenhar um mecanismo crioprotetor celular mais eficiente e bem como, uma maior permeabilidade à membrana espermática, causando um menor estresse osmótico às células.

Os resultados de motilidade total e progressiva óptica, motilidade total e progressiva computadorizada e viabilidade espermática (fluorescência) do Experimento II, na sua maioria os resultados sofreram uma grande variação entre indivíduos e também entre ejaculados (Anexo 13), concordando com as variabilidades encontradas na resposta pós-descongelamento do sêmen congelado de garanhões entre raças (Alvarenga et al., 1996) e entre indivíduos (Vidament et al., 1997), porém a dimetilformamida e sua associação com o glicerol de uma forma geral foram superiores ao glicerol.

Os tratamentos II (1,5%GL+3,5%DF) e III (5%DF), foram superiores aos tratamentos I (3,5%GL+1,5%DF) e IV(5%GL) e o tratamento I superior ao tratamento IV na maioria dos parâmetros avaliados. Concordando com os resultados de Gomes et al., 2002, onde utilizaram o sêmen de garanhões Mangalarga Marchador que apresentavam baixa resposta pós-descongelamento com o glicerol a 5%, e encontraram uma superioridade aos parâmetros de motilidade óptica e computadorizada com sêmen congelado com dimetilformamida a 5%. Porém os resultados dos tratamentos III e IV diferiram dos obtidos por Keith (2000), onde o glicerol (0,55M) superou a dimetilformamida (0,55M), nas variáveis de Motilidade total computadorizada (60,5% e 36,7% respectivamente) e mostrou-se semelhante em relação à viabilidade espermática (45,2 e 44,9 respectivamente), por Graham (2000), onde o glicerol (0,6M), não apresentou diferença em relação a dimetilformamida (0,6M) nos parâmetros de motilidade total computadorizada (52% e 49% respectivamente) e viabilidade celular avaliado por citometria de fluxo (45% respectivamente), Alvarenga et al., (2000), onde a dimetilformamida (0,6M) e glicerol (0,55M) teve resultados semelhantes nas avaliações de motilidade total e progressiva computadorizada, viabilidade celular por citometria de fluxo.

A diferença dos resultados do presente trabalho em relação a trabalhos anteriores pode estar relacionado aos garanhões utilizados no presente experimento, onde a maioria dos garanhões apresentou uma baixa resposta pós-

descongelamento em relação aos parâmetros de motilidade e viabilidade celular quando utilizou-se o glicerol a 5%(TRAT. IV).

A utilização das associações entre o glicerol e a dimetilformamida, Trat. I e Trat. II objetivou avaliar a existência de um sinergismo entre o mecanismo de ação dos crioprotetores assim como a diminuição da concentração do glicerol do meio diluente, no intuito de diminuir sua toxicidade. O Trat. II foi superior ao Trat. I nas avaliações realizadas, isto pode estar relacionado menor concentração de glicerol no meio diluente do Trat. II (1,5%), concordando com as observações feitas por Burns e Reasner (1995) onde concluíram que as concentrações de 1 a 2% de glicerol foram superiores a concentração de 4 % nos parâmetros de motilidade total e progressiva computadorizada e velocidade espermática.

No entanto, Vidament et al., (2002) demonstraram que as concentrações de 1% de Glicerol e 1% de dimetilformamida e 3% de glicerol e 1% foram superiores, nos parâmetros de motilidade e viabilidade celular, as associações onde se utilizou uma maior concentração de dimetilformamida.

Os resultados encontrados com a utilização das associações de dimetilformamida e glicerol reforçam a hipótese de que os ganhões em sua grande maioria apresentavam uma maior sensibilidade ao glicerol, sendo isto também evidenciado nos resultados com a utilização do Trat. II (DF3,5%+GL1,5%) o qual possuía uma menor concentração de glicerol em relação ao Trat. I (DF1,5%+GL3,5%).

Finalmente, os resultados do presente trabalho demonstraram uma superioridade dos derivados de amidas em proteger as células espermáticas de ganhões frente aos danos relacionados a congelamento e descongelamento.

Estudos futuros se fazem necessários para verificar as razões pela melhor adaptação a estes crioprotetores, bem como determinar o potencial fertilizante dos espermatozoides de ganhões congelados com diferentes formas de amidas.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente experimento nos permitem concluir que:

1 – O agente crioprotetor glicerol foi inferior a todos os derivados de amidas, no sentido de proteger os espermatozóides de garanhões contra os danos da congelação e descongelação.

2 – Dentre as amidas estudadas a dimetilformamida foi de uma forma geral mais eficiente em crioproteger os espermatozóides de garanhões.

3 – A melhoria da qualidade do sêmen pós-descongelação quando do uso da dimetilformamida se refletiu em melhoria significativa da fertilidade.

4 - A associação do glicerol e dimetilformamida permitiu a redução da concentração usual de glicerol, contudo não foi superior a dimetilformamida isoladamente.

5 - A avaliação da integridade acrossomal através de fluorescência pelo FITC-PNA e microscopia eletrônica de transmissão (MET), apresentaram uma boa correlação, quando considerados normais danos leves a membrana acrossomal observado na MET, sendo a avaliação da integridade acrossomal por fluorescência pelo FITC-PNA um exame de maior aplicabilidade na rotina de avaliação espermática.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AISEN, E. G., CISALE, H., FERNANDEZ, H. Criopreservacion de semen ovino. Nueva técnica. **Vet. Argent.**, v. 7, p. 176-82, 1990.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JUNIOR, J. The effect of breed and spermatic parameters over equine semen freezability. In: SYMPOSIUM ON STALLION SEMEN, 1996, Amersfoort. **Proceedings...** Amersfoort, 1996
- ALVARENGA, M.A.; GRAHAM, J.K.; KEITH, S.L.; LANDIM - ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, S.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 2000. **Proceedings...** Stockholm , 2000a, p.157.
- ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging system. **Equine vet. j** v.32(6), p. 541-5, 2000b.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of criopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Vet. Scie.** v. 7, p. 145-73, 1987.
- AN, T.Z.; IWAKIRI, M.; EDASHIGE, K.; SAKURAI, T.; KASAI, M. Factors affecting the survival of frozen – thawed mouse spermatozoa. **Cryobiology** p.237-49, 2000.
- ANZAR, M.; HASSAN, M..M.; GRAHAM, E.F.; DEYO, R.C.M.; SINGH. G. Efficacy of the Hamilton Thorn motility analyzer (HTM-2030) for the evaluation of bovine semen. **Theriogenology**. v.36, n.2, p.307-17, 1991.
- ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria

- (ASMA). São Paulo, 2000. 85p. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K., FULLER, B. J. eds. **Temperature and animal cells**. Cambridge: The Co. of Biologists Ltd. P. 395-406, 1987.
- BALL, B.A; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **J. Andrology** Nov-Dec., v.22(6) p.1061-9, 2001.
- BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in the mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. **Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.** v.21, p.47-50, 1957.
- BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M.; FAUQUANT, J.; PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**. v.48 p.391-410, 1997.
- BLACH, E.L.; AMANN, R.P.; BOWEN, R.A. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. **Theriogenology**, v.31 p.283, 1989.
- BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reprod. Science**. v.65, p.75-88, 2001.
- BRAUN, J.; HOCHI, S.; OGURI, N.; SAT, K.; TORRES-BOGINNO, F. Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen – thawed stallion spermatozoa. **Cryobiology** v.32 p.487-92, 1995.
- BURNS, P.J.; REASNER, D.S. Computadorized analysis of sperm motion: Effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.** v.15, n.9, p.377-80, 1995.

- CABRITA, E.; ALVAREZ, R.; ANEL, L.; RANA, K.L; HERRAEZ, M.P; Sublethal damage during Cryopreservation of Rainbow Trout Sperm. **Cryobiology** v.37 p.245-53, 1998.
- CHENIER, T.; MERKIES, K.; LEIBO, S.; PLANT, C. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. In: PROCEEDINGS FOR ANNUAL MEETING, Baltimore 1998. **Proceedings**. Maryland. 1998, p.52-3.
- CHRISTENSEN, P.; PARLEVLIET, J.M.; VAN BUITEN, A.; HYTTEL, P.; COLENBRANDER, B. Ultrastructure of fresh and froze-thawed stallion spermatozoa. **Biol. Reprod. Mono.** v.1 p.769-77, 1995.
- CRITSER, J. K.; HUSE-BENDA, A.R.; AAKER, D.V.; AMESON, B.W.; BALL, G.D. Criopresevation of human spermatozoa. III. The effect of crioprotectants on motility. **Fertil. Steril.** v.50 p.314-20, 1988.
- CRITSER, J. K. Principle of Cryobiology. In: SEMEN CRYOPRESERVATION & ARTIFICIAL INSEMINATION SYMPOSION, Nashville 1999. **Proceedings...** Tennessee. 1999. p. 241-8.
- CRITSER, J.K.; MOBRAATEN, L.E. Criopreservation of Murine Spermatozoa. **ILAR Journal**. v. 41(4) p.197-206, 2000.
- CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVESTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detection acrosome reacted human sperm. **Gamete Research**, v.15, p.213-26, 1986.
- DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**. v. 49. p.831-41. 1997.
- DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A.; WHITE, I. G. The effect of cold-shock and freeze-tawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. **Aust, J. Biol. Reprod.** v. 26, p. 1409-20, 1973.

- DE LEEUW, F.E.; DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.HG.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Effects of various crioprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v.30 p.32-44, 1993.
- DEMICK, D.S.; VOSS, J.L.; PICKETT, B.W. Effect of cooling, storage with glycerolization and spermatozoa number on equine fertility. **J. Anim. Sci.**, v.43, p.633-7, 1976.
- DEWIT, M.; MARLEY, W.S.; GRAHAM, J.K. Fertilizing potential of mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. **Cryobiology** v.40 p.36-45, 2000.
- DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; ANCHORDOGUY, T.; OVERSTREET, J.W.; CROWE, J.H. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **J. Exp. Zool.** v.265, p. 432-7, 1993.
- FAHY, G. M. The relevance of crioprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology**. v.23, p. 1-13, 1986.
- FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGLAS, M.S.J.; MERYMAN, H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction. In search of molecular mechanisms. **Cryobiology.**, v.27, p.247-68, 1990.
- FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L.; Assessment of Psium sativum agglutinin in identifying acrossomal damage in stallion spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.** v.32 p. 27-32, 1992.
- FERREIRA, J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelção do sêmen eqüino**. Botucatu, 2000. 113p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5ml straws. **Mol. Reprod. Dev.**, v.25 (2), p.123-9, 1990.
- FISHER, L.O; BELLE, G.V. Biostatistics a methodology for the health sciences. Wiley- Interscience, New York, 1993. 991p.
- FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.** v.49 p.277-84, 1977.
- GAO, D. Y.; ASHWORTH, E.; WATSON, P. F.; KLEINHANS, F. W.; MAZUR, P.; CRITSER, J. K. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. **Biol. Reprod.** v. 49, 112-23, 1993.
- GAO, D. Y.; LIU, J.; LIU, C.; MC GANN, L. E.; WATSON, P. F.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J. K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reprod.** v. 10, p. 1109-22, 1995.
- GAO, D.; CRITSER, J.K. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. **ILAR Journal** v. 41 (4), p.187-96, 2000.
- GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol. Reprod** v.34 p.127-38, 1986.
- GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.; ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology.** v.58, p.277-9, 2002.
- GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.** v.12 p.119-30, 1996.
- GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL

REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 2000. **Proceedings...** Stockholm, 2000 p.307 [abstract].

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, p.1241-52, 1992.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; ZANEVELD, L.J. Nonbeneficial effects of glycerol on the oocyte penetrating capacity of cryopreserved and incubated human spermatozoa. **Cryobiology**, v.22(5), p.434-7, 1985.
- JUHASZ, J.; NAGY, P.; KULCSAR, M.; HUSZENICZA, G.Y. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: A Review. **ACT. VET. BRNO.**, v.69 p.247-59, 2000.
- KAROW, A.M. **Cryobiology 2001 for mammalian embryologists**. Botucatu, 2003. Disponível no site [www.xytext.com.br]. Acesso em 26/02/2003.
- KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.1217-27, 1997.
- KATILA, T.; COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.48(7), p.1217-27, 1997.
- KAZUKO, A.; MASANORI, O.; KOUICHI, T.; YUJI, I. Cryopreservation of Medaka spermatozoa. **Zool. Science**, v.14(4), p.641-4, 1997.
- KEITH, S.L., **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. Colorado.1998. 104p. Tese. Colorado State University Fort Collins.
- KUNDU, C.N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G.C. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v.40, p.117-25, 2000.

- KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUNDER, G.C. Effect of amino acids on goat epididymal sperm Cryopreservation using a chemically defined model system. **Criobiology**, v.41, p.21-7, 2001.
- LAKE, P.E.; RAVIE, O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. **British Poultry Science**, v.25, p.145-50, 1984.
- LANDIM-ALVARENGA, F. C.; ALVARENGA, M. A.; GRAHAM, J. K.; SQUIRE, E. L. Viability and ultra structure of stallion spermatozoa cryopreserved with glycerol and DMSO. In: 3rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON STALLION REPRODUCTION. Fort Collins 2001. **Proceedings...** Fort Collins: Colorado State University, Colorado, 2001. p.61.
- LOOMIS, P.R.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA- lactose-egg yolk and packaged in straws. **J. Anim. Sci.**, v.56, p.687-93, 1983.
- LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.191-200, 2001.
- LOVELOCK, J.E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochem. J.**, v.58, p.618-22, 1954.
- MAGISTRINI, M.; GUITTON, E.; LEVERN. Y.; NICOLLE, J.C.; VIDAMENT, M.; KERBOEUF, D.; PALMER, E. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. **Theriogenology**, v.48, p.1229-35, 1997.
- MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen: a review. **Theriogenology**, v.48, p.523-30, 1997.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **J. Reprod. Fertil Suppl.**, v.27, p.47-51, 1979.

- MAZUR, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **J. Gen. Physiol.**, v.47, p.347-69, 1963.
- MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. Proc 9th Int Cong. Animal Reprod and A. I., v.2, p.99-114, 1980.
- MAZUR, P. Equilibrium, quasi-equilibrium and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophys**, v.17, p.53-92, 1990.
- MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FAGUNDES, A.C. Congelamento de sêmen equino em etilenoglicol ou glicerol: motilidade, vigor e teste de termo resistência – estudos preliminares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, Belo Horizonte, 1995. **Proceedings...**Belo Horizonte, 1995. p.290.
- MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.999-1012, 1992.
- MORRISON, D.F. Multivariate Statistical methods. 3rd ed., New York., Mc yarrow- Hill, 1990, 450p.
- MULDREW, K.; MC GANN, M. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. **Biophys. J.**, v.66, p.532-41, 1994.
- MULLER, Z. Fertility of frozen semen. **J. Reprod. Fert.**, suppl.32, p.47-51, 1987.
- MULLER, Z. Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. **J. Reprod. Fert.**, Suppl.35, p.121-5, 1987.
- MURDOCH, R.N.; JONES, R.C. The effects of glycerol on the metabolism and ultrastructure of boar spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v.54, p.419-22, 1978.

- MURTHY, S.S.N. Some insight into the physical basis of the cryoprotective action of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol. **Cryobiology**, v.36, p.84-96, 1998.
- NAGASE, H.; TOMIZUCA, T.; HANADA, A.; HOSODA, T.; MORIMOTO, H. Cryoprotective action of some amides on spermatozoa of domestics animals. I. Effects of formamide, acetamide and lactamide on the motility of bovine spermatozoa after pellet freezing. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v.18, n.1, p.15-21, 1972.
- NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERUMAN, H. T. **Cryobiology**. New York: Academic Press., p.179-220, 1966.
- NEVES NETO, J.R., MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A. Fertilidade do sêmen congelado eqüino em etilenoglicol e glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, Belo Horizonte, 1995. **Proceedings...** Belo Horizonte, 1995. p.292.
- OEHNINGER, S.; DURU, N.K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.169, p.3-10, 2000.
- OGIER DE BAULNY, B.; LE VERNE, Y.; KERBOEUF, D.; MAISSE, G. Flow Cytometric Evaluation of Mitochondrial Activity and Membrane Integrity in Fresh and Cryopreserved Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Spermatozoa. **Cryobiology**, v.34, p.141-9, 1997.
- OGIER DE BAULNY, B.; LABBÉ, C.; MAISSE, G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different crioprotectants. **Cryobiology**, v.39, p.177-84. 1999.
- PACE, M.M.; SULLIVAN, J.J. Effect of insemination, number of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v.23, p.115-21, 1975.

- PANAYOTA, N.Z.Z.; ASLANIS, P.; ZAVOS, P.M.; CORREA, J.R.; ANTIPAS, S. Occurrence of osmotic shock in human spermatozoa: its effects on the qualitative measurements of frozen-thawed spermatozoa. **Middle East Fertility Society Journal**, v.3, n.1, p.66-72, 1998.
- PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Inseminação Artificial com sêmen a fresco. **Revista do Cavalo Mangalarga**, v.12, p.16-23, 1987.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-22, 1992.
- PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membrane. **Cryobiology**, v.29, n.2, p.255-66, 1992.
- PHILLIPS, J.J.; BRAMWELL, R.K.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rooster sperm using methyl cellulose. **Poult. Sci.**, v.75, n.7, p.915-23, 1996.
- POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666, 1949.
- PONCHIROLI, C.B.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A.; CARVALHO, L.R.; GRAHAM, J.K. Induction of acrosome reaction in fresh and frozen/thawed bovine and equine semen treated with calcium ionophore A23187, dialauroylphosphatidylcholine and methyl- β -cyclodextrin, In: 28TH ANNUAL CONFERENCE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguaçu. **Proceeding...** Foz do Iguaçu, 2002. p.692
- 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.

- SEXTON, T.J. Relationship of the method of addition and temperature of cryoprotective agents to the fertilizing capacity of cooled chicken spermatozoa. **Poultry Science**, v.54, n.3, p.845-8, 1975.
- SMITH, A.U.; POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperature. **Nature**, v.166, p.668-9, 1950.
- SONGSASEN, N.; YU, I.; MURTON, S.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. **Cryobiology**, v.44, p.79-90, 2002.
- SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.L.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. **Cooled and Frozen Stallion Semen. Fort Collins: animal Reproduction and Biotechnology laboratory, 1999.** (Apostila).
- SZTEIN, J.M.; NOBLE, K.; FARLEY, J.S.; MOBRAATEN, L.E. Comparasion of Permeating and Nonpermeating Cryoprotectants for Mouse Sperm Cryopreservation. **Criobiology**, v.41, p.28-39, 2001.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LE LANNOU, D.; BARRIÈRE, P.; TAINTURIER, D. Improvement of motility of post- thaw Poito jackass sperm using glutamine. **Theriogenology**, v.45, p.1015-27, 1996.
- TRIMECHE, A.; YVON, J.M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Effects of glutamine, proline, histiine and betaine on post-thaw motilityof stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.52, p.181-91, 1999.
- TSELUTIN, K.; NARIBINA, L.; MAVRODINA, T.; TUR, B. Cryopreservation of poultry semen. **British Poultry Science**, v.36, p.805-11, 1995.
- TSELUTIN, K.; SEIGNEURIN, F.; BLESBOIS, E. Comparison of Cryoprotectants and Methods of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. **Poultry Science**, v.78, p.586-90, 1999.

- VARNER, D.D.; VAUGHAN, S.D.; JOHNSON, L. Use of a computadorized system for evaluation of equine spermatozoa motility. **Am. J. Vet. Research.**, v.52, p.224-9, 1991.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen freezability and fertility fiel results. **Theriogenology**, v.48, p.907-17, 1997.
- VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addtion of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.907-19, 2000.
- VIDAMENT, M.; YVON, J.M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; NGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTRON, S.; LE TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.201-18, 2001.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, J.M.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P.; BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/ or dimethyl formamide. **Theriogenology**, v.58, p.1-3, 2002 (abstract).
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.23-53, 2000.
- VISKANTA, R.; BIANCHI, M.V.A.; CRITSER, J.K.; GAO, D. Solidification processes of solutions. **Cryobiology**, v.34, p.348-62, 1997.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post- thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, p.871-91, 1995.

- WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. In: FINN, C. A. **Oxford reviews of reproductive biology**. New York: Oxford Univ Press., v.1, p.283-330, 1979.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-1, p.481-92, 2000.
- WATSON, P.F.; MARTIN, I.C. Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrossomal structures of frozen ram spermatozoa. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.28, n.2, p.153-9, 1975.
- WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, Drying, and/or Vitrification of Membrane-solute-water systems. (Review). **Cryobiology**, v.39, p.103-29, 1999.
- WOWK, B.; DARWIN, M.; HARRIS, S.B.; RUSSEL, S.R.; RASH, C.M. Effects of solutes methoxilation on glass-forming ability and stability of vitrification solutions. **Cryobiology**, v.39, p.215-27, 1999.
- YLDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v.54, p.579-85, 2000.
- ZAHN, F.S. **Efeito da incorporação de colesterol na membrana plasmática de espermatozóides sobre os parâmetros espermáticos e índice de fertilidade do sêmen congelado na espécie eqüina**. Botucatu, 2001. 109p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Botucatu, 1998. 121p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The present work aimed to investigate several kinds of amides to freeze equine semen. Two ejaculates from 20 stallions of different breeds were used. All ejaculates with initial motility greater than 60 % were split and frozen in 0.5 ml French straws in a milk base extender (INRA 82) containing the different studied cryoprotectants. The post-thaw percentage of motility and other motility parameters were evaluated using CASA. To evaluate cell viability fluorescent probes were used. Stains used were Carboxyfluorescein and propidium iodine (PI).

The first experiment was designed to investigate the protective effect of 3 amides; Dimethyl acetamide at 3 concentrations - 1, 3 and 5 % v/v; dimethyl formamide at 5% and methyl formamide at 5%. Differences on motion parameters between cryoprotectant treatments were determined by analysis of variance using SAS system.

Utilization of amides significantly improved most of parameters evaluated when compared with Glycerol. Progressive motility evaluated by optical microscopy was higher ($p < 0.0001$) for semen that was frozen with MF 5% and DF5%. The progressive motility evaluated by CASA was higher for the MF 5 % and DA 3% groups. The electron microscopy evaluation showed that DA 5% and MF 5 % were superior in the ability to preserve the acrossomal integrity. The acrossomal status evaluated by fluorescence showed that the preservation was higher on the groups DA 5%, MF 5 % and DF5% ($p < 0.0001$).

On the second experiment the cryoprotective effect of two associations of glycerol (Gly) and dimethylformamide (DF) were tested (Gly 3.5% + DF 1.5 % and DF 3.5% + Gly 1.5%).

No combination of cryoprotector was superior to dimethyl formamide alone for total motility ($p < 0.05$). An increase in total motility was observed when the associations were compared with Glycerol alone. Post-thaw motility of sperm frozen with glycerol was significantly lower than the other treatments ($p < 0.05$). No differences ($p < 0.05$) were observed on progressive motility between the treatments. Total motility and progressive motility were 48% and 19%, 57% and 19%, 59% and 18%, 38% and 16% for semen frozen with 1.5% DF + 3.5% Gly, 3.5% DF + 1.5% Gly, DF 5% and Gly 5% respectively. There was also a decrease in the percentage of viable cells with the utilization of glycerol alone.

The correlation between the fluorescence and electron microscopic techniques was positive ($r = 0.85$) and significant ($p < 0.05$) for the acrossomal integrity evaluation.

Thirty mares were inseminated, between October and November of 2001, with a frozen semen from one stallion. First cycle pregnancy rates after insemination with semen frozen with DF 5% and GLY 5% was 40 % (6/15) and 0% (0/15), respectively and DF5%.

The results of these experiments showed that the amides protected stallion sperm from cryo-damage better than glycerol.

ANEXO 1 - Formulação do meio diluente de Kenney (Kenney et al.,1975).

CONSTITUINTE	QUANTIDADE
Glicose	49g
Leite desnatado	24g
Bicarbonato de sódio a 10%	7,5ml
Gentamicina	200mg
Água bidestilada	1000ml

ANEXO 2 - Formulação do meio diluente INRA 82 (Palmer, 1984).

Constituinte	Quantidade
Glucose	2,5g
Lactose	0,15g
Rafinose	0,15g
Citrato de Sódio	0,03g
Citrato de Potássio	0,04g
Água bidestilada (q.s.p)	50ml
Leite desnatado	42,5ml
Gema de Ovo	2,5ml
Ticarcilina	0,500g
Glicerol	5,0ml

ANEXO 3 - Valores de osmolaridade e pH dos meios diluentes utilizados na congelação das amostras de sêmen no experimento I e experimento II.

Trat.	OSM	pH
I	1280	6,93
II	1490	7,02
DA1	642	6,95
DA3	887	6,93
DA5	1123	7,02
MF5	1406	6,89
DF5	1321	7,03
GLIC5	1103	6,97

ANEXO 4 - Ajuste do HTM – IVOS – 10 para as realizações das análises seminais em eqüinos (Ferreira, 2000).

Característica	Ajuste
Numero de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60pixels
Tamanho mínimo das células	3 pixels
Contraste para células móveis	30 pixels
Limite inferior para o índice retilíneo	80%
Referência para velocidade média (VAP)	<70 μ m/s
Referência para velocidade lenta (VCL)	<30 μ m/s
Referência para velocidade lenta (VSL)	<20 μ m/s
Limite inferior de tamanho	0,62 pixel
Limite superior de tamanho	2,98 pixel
Limite inferior de intensidade	0,24
Limite superior de intensidade	1,19
Limite inferior de alongamento	0%
Limite superior de alongamento	100%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95

ANEXO 5 - Soluções de estoque para a utilização na técnica de fluorescência para avaliação de integridade de membrana.

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

ANEXO 6 - Solução de Trabalho para coloração fluorescente.

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

ANEXO 7 - Valores de motilidade total e progressiva avaliados por microscopia óptica, dos diferentes garanhões utilizados no experimento I segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, FD5, GL5.

GAR	MTODA1	MTODA3	MTODA5	MTOMF5	MTODF5	MTOGL5	MPODA1	MPODA3	MPODA5	MPOMF5	MPODF5	MPOGL5
GOR.1EJ	65	60	30	70	30	25	20	20	5	20	10	10
GOR.2EJ	60	50	35	40	25	20	10	10	5	10	10	10
BAR.1EJ	40	50	50	50	60	35	10	10	10	15	15	0
BAR.2EJ	40	50	60	50	60	30	10	15	20	15	20	10
JJ.1EJ	45	50	55	45	60	35	15	15	20	20	25	10
JJ.2EJ	15	40	45	50	65	25	5	10	5	5	15	5
G9.1EJ	70	80	70	50	65	50	20	35	30	30	30	20
G9.2EJ	50	60	70	60	60	20	20	20	15	20	15	10
G11.1EJ	20	45	30	50	40	20	10	10	15	20	5	5
G11.2EJ	45	45	60	40	60	20	20	20	15	10	15	10
G12.1EJ	30	30	30	55	55	20	10	10	5	20	15	10
G12.2EJ	30	50	60	60	50	25	10	15	20	20	10	0
G13.1EJ	40	45	55	65	65	20	10	10	15	25	25	10
G13.2EJ	20	60	65	50	50	30	10	10	15	15	15	10
G14.1EJ	40	40	60	45	60	40	10	10	10	10	15	20
G14.2EJ	40	45	50	55	50	20	10	15	10	15	15	5
G15.1EJ	30	30	25	30	35	20	15	10	5	10	10	5
G15.2EJ	15	45	10	35	40	20	5	10	5	15	10	5
G16.1EJ	40	50	55	40	60	20	10	15	15	20	10	5
G16.2EJ	45	55	30	60	60	50	15	20	5	15	10	15

ANEXO 8 - Valores de motilidade total e progressiva computadorizada, dos diferentes garanhões utilizados no experimento I segundo os tratamentos; DA1, DA3, DA5, MF5, DF5, GL5.

GAR	MTHDA1	MTHDA3	MTHDA5	MTHMF5	MTHDF5	MTHGL5	MPHDA1	MPHDA3	MPHDA5	MPHMF5	MPHDF5	MPHGL5
GOR.1EJ	70	70	32	69	53	24	25	16	2	13	6	12
GOR.2EJ	61	50	37	36	53	19	14	8	2	6	7	8
BAR.1EJ	35	45	52	51	57	30	9	7	6	16	11	0
BAR.2EJ	38	51	60	46	58	40	15	17	16	20	19	8
JJ.1EJ	44	60	56	46	66	34	23	32	25	20	22	14
JJ.2EJ	14	35	31	34	50	40	2	9	2	10	11	1
G9.1EJ	65	81	72	57	78	54	25	37	21	24	37	23
G9.2EJ	54	63	68	61	56	25	22	18	10	25	11	11
G11.1EJ*	25	40	31	49	18	27	6	9	11	18	4	1
G11.2EJ*	40	42	57	34	57	20	16	16	16	13	13	6
G12.1EJ*	29	28	29	52	53	20	7	8	2	15	11	5
G12.2EJ*	26	50	58	59	48	27	7	17	18	22	9	1
G13.1EJ	36	45	70	70	60	49	13	12	22	30	12	18
G13.2EJ	23	57	60	54	48	37	6	17	17	17	12	12
G14.1EJ	37	35	57	42	55	45	14	13	8	15	18	15
G14.2EJ	35	47	44	51	47	25	10	10	6	21	10	4
G15.1EJ*	29	34	23	25	36	20	10	9	4	7	6	5
G15.2EJ*	15	50	19	20	45	15	3	12	1	5	11	4
G16.1EJ	39	54	43	64	62	26	12	16	6	30	11	8
G16.2EJ	48	63	34	67	57	55	18	22	5	21	12	19

ANEXO 9 - Valores de vigor avaliado por microscopia óptica e linearidade (%) avaliado pelo HTM, dos diferentes garanhões utilizados no experimento I, segundo os tratamentos DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.

GAR	VIGDA1	VIGDA3	VIGDA5	VIGMF5	VIGDF5	VIGGL5	LINDA1	LINDA3	LINDA5	LINMF5	LINDF5	LINGL5
GOR.1EJ	2	2	1	2	2	2	42	38	38	37	36	45
GOR.2EJ	2	2	2	2	2	2	41	39	35	39	36	47
BAR.1EJ	2	2	2	2	2	0	38	39	35	41	37	33
BAR.2EJ	2	3	3	3	3	3	46	45	40	46	40	45
JJ1EJ	2	2	2	2	2	2	36	52	48	39	56	24
JJ2EJ	2	2	2	2	3	1	49	39	37	41	42	45
G91EJ	3	3	3	3	3	3	44	44	41	44	43	47
G92EJ	3	3	3	3	3	3	46	39	38	42	40	43
G111EJ	2	2	2	2	2	2	44	40	44	42	40	37
G112EJ	2	2	2	2	2	2	47	46	39	42	37	40
G121EJ	2	2	1	2	2	2	42	40	34	42	38	43
G122EJ	2	2	2	2	2	0	50	44	42	44	39	50
G131EJ	2	2	2	2	3	2	43	41	34	42	35	42
G132EJ	2	2	2	2	2	2	46	43	44	42	45	43
G141EJ	2	2	2	2	2	2	44	42	37	43	39	43
G142EJ	2	2	2	2	2	2	38	41	35	44	35	42
G151EJ	2	2	2	2	2	2	45	43	41	43	42	39
G152EJ	2	1	2	2	2	2	40	35	43	40	39	42
G161EJ	2	2	2	2	2	2	48	42	43	47	39	46
G162EJ	2	2	2	2	2	2	42	42	41	42	39	45

ANEXO 10 - Valores de viabilidade celular avaliado por fluorescência (PI e FDA), dos diferentes garanhões utilizados no experimento I, segundo os tratamentos DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.

GAR	FL.DA1	FL.DA3	FL.DA5	FL.MF5	FL.DF5	FL.GL5
GOR1EJ	55	41	44	47	51	27
GOR2EJ	58	41	49	36	50	21
BAR.1EJ	43	41	57	53	56	43
BAR.2EJ	40	38	43	44	47	34
JJ1EJ	48	58	51	59	41	19
JJ2EJ	31	28	48	55	33	26
G91EJ	38	41	41	38	40	14
G92EJ	47	36	34	38	51	33
G111EJ	36	48	55	57	62	38
G112EJ	33	43	46	52	55	48
G121EJ	54	59	60	44	60	45
G122EJ	51	51	48	52	52	40
G131EJ	41	36	57	54	59	36
G132EJ	30	40	52	37	45	32
G141EJ	50	55	54	60	51	35
G142EJ	57	43	48	63	68	34
G151EJ	31	40	40	45	56	27
G152EJ	47	34	44	31	54	24
G161EJ	49	52	38	51	48	37
G162EJ	53	58	44	50	48	34

ANEXO 11 - Valores de VAP e VSL avaliados pelo HTM, dos diferentes ganhões utilizados no experimento I, segundo os tratamentos DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.

GAR	VAPDA 1	VAPDA 3	VAPDA 5	VAPMF 5	VAPDF 5	VAPGL 5	VSLDA 1	VSLDA 3	VSLDA 5	VSLMF 5	VSLDF 5	VSLGL 5
GOR1E J	90,8	88,2	56,5	80,7	81	72,5	69	63,8	40,1	58	54,4	57,3
GOR2E J	82,1	74,8	61,9	78,7	78,3	78,3	60,2	54,7	42,2	57,8	52,5	57,3
BAR1EJ	76,9	72,6	76,9	81,3	87,3	68,7	56,5	53,2	53,1	61,6	60,4	46,9
BAR2EJ	81,3	82	90,4	80,6	97,4	72,8	65,9	62,7	65,5	65,5	70,4	56,7
JJ1EJ	97,7	114,9	116,6	113,4	111	99,2	78,1	89,8	86,5	84,3	78,2	75,6
JJ2EJ	56,1	84,2	54,9	82,1	83,6	62,2	47,6	61,4	38,8	62,9	60,8	49,2
G91EJ	81,9	88,9	78,6	86,9	100,5	84,9	64,5	69,5	58,5	67,6	76,5	69,2
G92EJ	87,2	80	71,5	87,1	80,3	79,5	68,8	60,3	51,4	66,7	57,2	68,2
G111EJ	74,9	77,1	78	86	86,9	77	58,3	57,2	62,4	66,8	62,2	53,4
G112EJ	83,2	82,4	105,6	93,5	104,4	81,6	67,1	67	74,1	71,9	70,5	60
G121EJ	70,4	69,3	57,8	72,9	74,4	70,5	54,9	54,7	42	57,5	54,7	57,2
G122EJ	70,2	80,4	81,7	82	73,8	56,8	57,8	62,4	61,9	63,8	54,1	48
G131EJ	87,9	79	100,2	99,2	92,9	92,8	69,3	60,3	72,6	76	61,9	70,2
G132EJ	71,4	81,2	76	79,4	89	80,8	57	62,2	58,7	61,1	70,7	62,1
G141EJ	83,9	91,6	77	82	96,2	83	64,9	70,4	54	62,3	69,6	63,8
G142EJ	80,5	80,6	78,8	89,1	93,8	77,2	59,8	59,1	53,1	68,3	61,4	59,7
G151EJ	87	89	82,6	85,1	88,9	90,7	67,2	65,4	59	64,1	63,7	65,2
G152EJ	98,5	95,5	66,1	83,1	95,2	85,4	69,8	64,9	47,6	65,2	65,9	62,3
G161EJ	75,8	80,2	67,2	90,8	78,9	73,1	60,2	60,2	48,1	72,8	55,6	58,1
G162EJ	96,1	85,4	65,6	78,9	77,1	82,9	72,5	64,6	50,8	60,3	55,4	64,2

ANEXO 12 - Valores de VCL e percentagem de rápidos avaliados pelo HTM, dos diferentes ganhões utilizados no experimento I, segundo os tratamentos DA1, DA3, DA5, MF5, DF5 e GL5.

GAR	VCLDA 1	VCLDA 3	VCLDA 5	VCLMF 5	VCLDF 5	VCLGLI 5	RAPDA 1	RAPDA 3	RAPDA 5	RAPMF 5	RAPDF 5	RAPGLI 5
GOR1E J	168,6	169,8	109,4	161,4	161	136,4	50	46	7	40	28	25
GOR2E J	159,1	146,3	126,8	155,8	151,3	139,3	32	22	9	17	26	19
BAR1EJ	151,4	139	153,4	153	166,7	142,1	20	19	26	34	37	1
BAR2EJ	145,5	143,8	162,9	144,4	178,6	129,4	23	33	42	29	45	15
JJ1EJ	169,5	200,2	209	212	206	181,4	36	52	48	39	56	24
JJ2EJ	100,4	163,3	103	159,7	156,8	118,4	3	22	5	21	29	2
G91EJ	151	159,1	146,8	157,7	181,1	148,3	41	69	45	41	69	35
G92EJ	151,3	154,3	135,8	159,2	146,1	157	36	37	27	43	33	14
G111EJ	136,3	144,5	147,2	163,7	163,9	163,4	10	18	18	31	10	3
G112EJ	147,4	149,9	199,8	178,6	195,3	160	24	24	46	25	48	14
G121EJ	134,3	142,8	125,7	138,4	145,1	138	12	15	6	26	26	9
G122EJ	120,8	145,9	151,3	149,5	140,8	102,5	11	29	36	40	23	3
G131EJ	167,9	151,7	190,4	184,4	182,2	172,2	21	23	53	57	43	35
G132EJ	129	145,2	136,8	150,6	160,7	148,9	10	33	35	31	33	23
G141EJ	153,1	173,5	147,7	152	183,1	151,6	25	25	27	28	44	29
G142EJ	160,3	152	156,1	164,8	184	148,3	21	31	25	38	34	8
G151EJ	158,6	161,9	153,2	155,6	158,7	176,1	19	21	14	15	16	13
G152EJ	190,4	194,1	119,4	153,3	173,9	160,8	11	41	3	16	34	10
G161EJ	131,5	145,5	111,7	160,9	145,8	132,4	20	35	15	48	33	14
G162EJ	177,7	157	127	144,7	144,9	147,6	35	48	12	43	32	38

ANEXO 13 - Valores de motilidade óptica (total e progressiva), dos diferentes garanhões utilizados no experimento II, segundo os tratamentos; I, II, III, IV.

GARANH.	M.T.O I	M.T.O II	MT.O III	M.T.O IV	M.P.O I	M.P.O II	M.P.O III	M.P.O IV
AST. 1EJ	35	35	50	20	15	15	25	5
AST.2EJ	65	55	65	40	30	20	30	20
BAR.1EJ	30	50	60	25	10	15	25	8
BAR.2EJ	45	30	60	40	25	15	15	15
G2.1EJ	60	70	75	50	20	30	30	25
G2.2EJ	30	60	60	45	20	30	40	15
G3. 1EJ	15	60	40	35	5	15	20	20
G3.2EJ	60	50	70	30	25	20	30	10
G4. 1EJ	60	65	70	40	25	20	20	20
G4.2EJ	70	75	70	55	30	35	30	30
G5.1EJ	55	70	70	40	25	20	20	20
G5.2EJ	60	70	70	40	30	30	25	20
G6.1EJ	60	60	60	60	20	15	15	25
G6.2EJ	50	65	60	60	20	30	20	25
G7.1EJ	30	50	35	10	10	10	10	2
G7.2EJ	40	50	60	15	10	15	20	0
STRM1EJ	60	50	50	10	15	10	10	2
STRM2EJ	40	45	40	20	10	12	10	10
GOR1EJ	55	60	70	20	10	10	10	5
GOR2EJ	50	65	65	30	10	15	10	5

ANEXO 14 - Valores de motilidade computadorizada (total e prog.) dos diferentes garanhões utilizados no experimento II, segundo os tratamentos I, II, III, IV.

GAR	M.T.H. I	M.T.H II	M.T.H III	M.T.H IV	M.P.H I	M.P.H II	M.P.H III	M.P.H IV
AST. 1EJ*	28	33	45	20	11	10	10	5
AST.2EJ	61	50	56	56	29	19	17	25
BAR.1EJ	33	48	62	12	12	16	17	4
BAR.2EJ	51	29	65	54	27	12	19	33
G2.1EJ	54	61	61	62	27	19	10	28
G2.2EJ	48	64	61	49	20	25	28	22
G3.1EJ	10	52	43	43	3	11	14	25
G3.2EJ	60	59	78	36	34	19	27	18
G4.1EJ	53	66	72	38	20	27	22	16
G4.2EJ	74	77	76	67	38	37	39	33
G5.1EJ	59	72	67	55	19	24	27	22
G5.2EJ	59	65	70	42	29	26	21	10
G6.1EJ	67	64	56	63	34	26	21	31
G6.2EJ	36	70	57	59	16	32	23	30
G7.1EJ	33	54	42	7	8	16	11	2
G7.2EJ	34	45	60	18	9	13	22	6
STRM1EJ	54	59	50	19	19	15	8	5
STRM2EJ	43	48	42	27	15	11	7	9
GORG1EJ	58	59	65	23	9	10	9	2
GORG2EJ	54	65	65	28	10	13	12	3

ANEXO 15 - Valores referentes à integridade celular avaliado por fluorescência (PI e FDA), dos diferentes garanhões utilizados no experimento II, segundo os tratamentos; I, II, III, IV.

GAR	FLU.V I	FLU.V II	FLU.V III	FLU.V IV
AST. 1EJ	47	46	62	40
AST.2EJ	45	44	60	34
BAR.1EJ	38	40	48	45
BAR.2EJ	33	34	48	26
G2.1EJ	38	40	50	26
G2.2EJ	40	42	48	39
G3.1EJ	18	47	40	28
G3.2EJ	39	46	50	27
G4.1EJ	43	46	59	30
G4.2EJ	40	42	49	34
G5.1EJ	26	39	47	27
G5.2EJ	22	36	38	21
G6.1EJ	43	43	50	28
G6.2EJ	38	48	49	30
G7.1EJ	35	45	38	19
G7.2EJ	37	42	52	18
STRM1EJ	34	42	46	12
STRM2EJ	37	50	59	33
GOR1EJ	50	52	48	22
GOR2EJ	54	57	50	26

ANEXO 16 - Valores de VAP e VSL, dos diferentes garanhões utilizados no experimento II, segundo os tratamentos I, II, III, IV.

GAR	VAP. I	VAP. II	VAP. III	VAP. IV	VSL. I	VSL. II	VSL. III	VSL. IV
AST.1EJ.	75,4	71,1	75,3	65,8	63	56,5	55,7	53,4
AST.2EJ.	95,1	80,6	91,7	91,2	74,8	60,6	64,6	71,7
BAR.1EJ.	77,5	77	102,2	82	63	60,1	70,2	64,1
BAR.2EJ.	100,8	89,7	95,7	98,6	81,3	69,7	68	81,7
STRM.1EJ.	88,8	97	85,8	77,5	68,2	69,3	57,3	60,1
STRM.2EJ.	103,4	99,8	98,9	87	75,6	69,5	66,8	68,4
GOR.1EJ	76,7	86,6	92,1	52,8	55,4	58,4	61,7	45
GOR.2EJ	78	90	88,9	63	56,1	62,8	60,2	49,7
G2.1EJ.	129,7	135,2	131,2	111,7	101,9	91,8	81,1	86,4
G2.2EJ.	88,3	93,9	97,2	91,7	70,1	70,9	75,9	72,6
G3.1EJ.	79,2	90,5	113	104,4	60,6	59,8	75,9	87,1
G3.2EJ.	84,1	74,6	84,3	84,3	69,7	57,9	63	71,4
G4.1EJ.	82,8	95,5	96	99,6	65,3	73,7	68,9	76,7
G4.2EJ.	99	109,1	12,3	111	78,9	84,5	93,6	86,9
G5.1EJ.	82,2	93,9	87,7	89,8	62,1	68,3	62,3	69,6
G5.2EJ.	81,4	100,8	96,7	72,6	66,4	75,1	70,1	57,1
G6.1EJ.	108,3	120,4	104,2	112,4	85,5	87,5	76,7	87,1
G6.2EJ.	124,5	116,4	122,5	105,6	91,1	88,2	88,2	84
G7.1EJ.	71,6	81,6	80,6	69,1	56,8	61,7	62,1	56,2
G7.2EJ.	74,9	92,3	90,1	82	57	64,9	66	61,6

ANEXO 17 - Valores de VCL e LIN, dos diferentes garanhões utilizados no experimento I, segundo os tratamentos I, II, III, IV.

GAR	VCL. I	VCL. II	VCL. III	VCL. IV	LIN. I	LIN. II	LIN. III	LIN. IV
AST.1EJ.	128	131,1	145,5	120,5	51	45	39	45
AST.2EJ.	176,8	161,1	176,7	168,3	43	39	37	44
BAR.1EJ.	135,9	140	193,2	138,6	48	44	38	49
BAR.2EJ.	170,1	162,2	170,8	163,8	50	46	41	52
STRM.1EJ.	155,8	174,3	156,1	137	45	58	38	46
STRM.2EJ.	184,6	184,1	180,2	153,1	54	40	38	50
GOR.1EJ	145,1	165,1	173,2	100,5	40	36	36	47
GOR.2EJ	146,5	170,8	166,2	114,6	40	37	37	47
G2.1EJ.	235,2	253,2	252,8	202,5	46	39	35	44
G2.2EJ.	165,3	172,7	180,2	174,2	43	42	43	42
G3.1EJ.	145,7	169,4	205,6	179,7	44	36	39	49
G3.2EJ.	144,1	137,8	154,2	146	49	43	42	51
G4.1EJ.	151,3	178,9	176,4	193,2	44	42	40	41
G4.2EJ.	180	195,7	212,1	199,8	44	44	45	45
G5.1EJ.	146,3	172	162,7	159,7	44	40	40	45
G5.2EJ.	138,1	181,4	170,9	124,2	50	42	42	48
G6.1EJ.	191,9	219,3	191,7	196	47	42	42	47
G6.2EJ.	206,9	211,3	220,1	184	48	44	43	48
G7.1EJ.	128,5	151	151,6	110,3	45	42	42	53
G7.2EJ.	144,8	178,1	173,6	160,4	41	38	39	40

ANEXO 18 - Percentagem de espermatozoides rapidos (HTM) e valores de Vigor (Microscopia óptica), dos diferentes garanhões utilizados no experimento II, segundo os tratamentos I, II, III, IV.

GAR	RAP. I	RAP. II	RAP. III	RAP. IV	VIG. I	VIG. II	VIG.III	VIG. IV
AST.1EJ.	16	17	24	8	2	2	2	1
AST.2EJ.	49	35	45	44	3	3	3	3
BAR.1EJ.	19	28	54	7	3	3	3	2
BAR.2EJ.	44	21	50	47	2	2	3	3
STRM.1EJ.	36	40	32	10	3	3	3	3
STRM.2EJ.	34	37	30	17	2	2	3	2
GOR.1EJ	26	36	40	4	2	2	2	2
GOR.2EJ	26	40	41	9	3	3	3	2
G2.1EJ.	46	52	35	53	3	3	3	3
G2.2EJ.	31	48	47	34	3	3	3	3
G3.1EJ.	4	34	36	35	3	3	3	2
G3.2EJ.	47	33	60	24	2	3	3	2
G4.1EJ.	33	50	55	29	3	3	3	3
G4.2EJ.	61	64	68	57	3	3	3	3
G5.1EJ.	40	57	49	41	2	2	2	1
G5.2EJ.	42	54	55	18	2	2	3	2
G6.1EJ.	56	54	44	54	2	2	2	1
G6.2EJ.	30	60	49	47	2	2	2	2
G7.1EJ.	13	32	23	3	2	2	2	1
G7.2EJ.	18	34	47	11	2	2	2	1