



Universidade de Brasília

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Efeito da diluição do crioprotetor dimetilformamida
em amostras de sêmen eqüino descongeladas
utilizando-se dois diferentes diluentes comerciais

MARINA FERREIRA ZIMMERMANN

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS

PUBLICAÇÃO: 256/2007

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2007

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**Efeito da diluição do crioprotetor dimetilformamida
em amostras de sêmen eqüino descongeladas
utilizando-se dois diferentes diluentes comerciais**

MARINA FERREIRA ZIMMERMANN

ORIENTADOR: PROF. DR. JAIRO PEREIRA NEVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2007**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**EFEITO DA DILUIÇÃO DO CRIOPROTETOR DIMETILFORMAMIDA EM
AMOSTRAS DE SÊMEN EQÜINO DESCONGELADAS UTILIZANDO-SE
DOIS DIFERENTES DILUENTES COMERCIAIS**

MARINA FERREIRA ZIMMERMANN

**PROJETO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDO À
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS AGRÁRIAS NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DE
DISCIPLINAS DE PRODUÇÃO ANIMAL.**

APROVADA POR:

Jairo Pereira Neves – Doutor, FAV - UnB

(Orientador); CPF: 065.863.509-30; e-mail:jpneves@unb.br;

Carolina Madeira Lucci – Doutora, FAV - UnB

(Examinador interno); CPF: 490.390.241-20; e-mail:clucci@unb.br;

José Robson Bezerra Sereno, PhD., EMBRAPA - CPAC

(Examinador externo); CPF: 224.518.114-04;

e-mail:sereno@cpac.embrapa.org;

BRASÍLIA/DF, 27 de fevereiro de 2007.

FICHA CATALOGRÁFICA

Zimmermann, Marina Ferreira

Efeito da diluição do crioprotetor dimetilformamida de amostras em sêmen eqüino descongeladas utilizando-se dois diferentes diluentes comerciais.

Marina Ferreira Zimmermann; orientação de Dr Jairo Pereira Neves. Brasília, 2007. 65 p. : il.

Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007.

1. Eqüino. 2. Diluente. 3. Crioprotetor. 4. Congelação. 5. Descongelção.
I. Neves, J.P. II. Dr .

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ZIMMERMANN, M.F. Efeito da diluição do crioprotetor dimetilformamida em amostras de sêmen eqüino descongeladas utilizando-se dois diferentes diluentes comerciais. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2007,. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Marina Ferreira Zimmermann

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:

GRAU: Mestre ANO: 2007

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

Marina Ferreira Zimmermann
086.281.617.32
SHIS QI 26 conj.04 casa 18
71670-040 – Brasília/DF - Brasil
3367-7205 ; marinazimmermann@uol.com.br

DEDICATÓRIA

Dedico à minha mãe querida pela conclusão de mais uma etapa; pela força e suporte na realização do curso de pós-graduação, bem como dos experimentos; pelos valores, educação, cultura, interesse por tudo o que está ao nosso redor, pelas conversas, broncas, confiança, amor, carinho, dedicação e por “finçar os meus pés no chão”.

Dedico também ao meu pai, *in memoriam*, pelo respeito, carinho, amor, pelas cartas na infância, doces “surras”, alegria, sensibilidade, humanidade, proteção e por “tirar os meus pés do chão”.

Por fim, dedico ao meu querido primo *Don Juan*, pela força, alegria, simpatia, encanto e mensagem de vida que nos deixou.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Jairo Pereira Neves pela orientação, confiança, ensinamentos, conversas e discussões.

À minha grande e querida família pela compreensão, ajuda, educação e cultura.

Aos queridos amigos que fiz neste curso, especialmente à colega Juliana Lopes Almeida, e aos que acompanham minha jornada.

Ao Professor Júlio Jacob, Vera Jesus e José Eugênio Três da UFRRJ pelas primeiras lições na área de Reprodução Animal, confiança, estímulo e amizade.

Ao Professor Dr. Frederico Ozanam Papa da UNESP/Campus Botucatu - SP pela disponibilidade de uso de seu laboratório, ensinamentos e pela dedicação, bem como de seus orientados Ms. Cely Marini Melo e Dr. José A. Dell'Aqua Jr., pela presteza e disponibilidade de tempo.

Aos doutores Rodolfo Rumpf, Roberto Sartori e Margot N. Dode da EMBRAPA/CENARGEN - DF por disponibilizarem o laboratório para o processamento do sêmen, bem como disponibilização dos animais.

Ao Médico Veterinário Adalberto Farinasso pelas idéias e confiança.

Ao Professor Dr. Cláudio Del Menezzi pela ajuda na revisão e cálculos estatísticos.

Especialmente aos meus tios Clóvis e Sinhô e primos André e Luiz Gustavo, pelo empréstimo de materiais e animais para realização do experimento.

Aos funcionários, Japão, Teco, Cowboy e Pelé pela ajuda e paciência.

Aos professores da pós-graduação do curso de Ciências Agrárias da FAV/UnB.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

Capítulos/Sub-capítulos	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Constituição da membrana plasmática	4
3.2 Capacitação espermática	6
3.3 Congelabilidade	7
3.4 Diluentes	9
3.5 Toxicidade dos crioprotetores à membrana plasmática	11
3.6 Crioprotetores	12
3.7 Amidas	14
3.8 Avaliações laboratoriais	17
3.9 Sêmen congelado e ambiente uterino, implicações	19
4. Raças nativas e sua conservação	21
5. OBJETIVO GERAL	23
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
7. CAPÍTULO ÚNICO	35
RESUMO	36
ABSTRACT	36
INTRODUÇÃO	37
MATERIAL E MÉTODOS	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	41

CONCLUSÕES	44
AGRADECIMENTOS	44
REFERÊNCIAS	44

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA

Página

CAPÍTULO ÚNICO

1. Comparação das médias (\pm) entre os diluentes e as diluições da motilidade espermática total e progressiva e de integridade de membrana plasmática de sêmen equino descongelado e tratado com diferentes diluentes (FR4® e BOTUCRIO®) e diluições (50 e 25%) no tempo final (Tf) 48

2. Médias (\pm), desvio-padrão e diferença significativa ($P < 0,05$) dos tratamentos de sêmen equino descongelado e tratado, avaliados pelo CASA e pelo teste de epifluorescência (IMP) no tempo inicial (Ti) e final (Tf) 49

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA

Página

CAPÍTULO ÚNICO

- 1. Expressão gráfica das médias em percentagem, através do teste de Dunnett, comparando o controle com os demais tratamentos e utilizando as variáveis MTi: motilidade total inicial, MTf: motilidade total final, MPi: motilidade progressiva inicial, MPf: motilidade progressiva final 47**

ANEXOS

ANEXO	Página
I. AJUSTE DO HTMA-IVOS-10 PARA ANÁLISE SEMINAL EM EQUINOS	50
II. PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ALH - Deslocamento lateral de cabeça do espermatozóide

BCF - Freqüência de batimento flagelar

BOT 50 e 25 - Diluidor Botu-Crio[®]

Ca⁺⁺ - Íon cálcio

CASA – Análise computadorizada da motilidade espermática

CFDA – Carboxi-fluoresceína

DMA - Dimetilacetamida

DMF - Dimetilformamida

DMSO- Dimetil-sulfóxido

FR 50 e 25 - Diluidor FR4[®]

GLY - Glicerol

IA – Inseminação Artificial

IMP – Integridade de membrana plasmática

LDL – Molécula de colesterol

MF – Metilformamida

MP – Motilidade progressiva

MT – Motilidade total

PI – Iodeto de propídio

RAP - Quantidade de espermatozóides rápidos

Tf – Tempo final

Ti – Tempo inicial

VAP – Velocidade média do espermatozóide

VCL – Velocidade curvilinear do espermatozóide

VSL - Velocidade progressiva do espermatozóide

RESUMO:

O presente estudo teve por objetivo avaliar parâmetros de motilidade e viabilidade *in vitro* na diluição do crioprotetor dimetilformamida a 5% pós-descongelção para concentrações de 2,5 e 1,25%, mediante utilização de dois diluentes comerciais adicionados junto ao sêmen de equino criopreservado. Após a descongelção as amostras foram diluídas com a finalidade de manter as concentrações finais (2,5 e 1,25%) de crioprotetor, utilizando-se dois diluentes comerciais (FR4[®] e Botu-Crio[®]) em dois tempos: inicial (Ti) e final (Tf). Foram utilizadas 13 amostras de ejaculados distintos de cinco garanhões de raças nacionais. Os parâmetros de motilidade foram observados através da análise computadorizada e os de integridade de membrana plasmática pela microscopia de epifluorescência. Verificou-se melhora nos parâmetros de motilidade total e progressiva dos espermatozóides, no tempo final ($P < 0,05$) com o diluente Botu-Crio[®] em relação ao FR4[®]. Não houve diferença, $P > 0,05$, entre os tratamentos quanto à a integridade de membrana plasmática.

Palavras chave: equino, diluente , crioprotetor , congelação, descongelção

ABSTRACT:

The purpose of the study reported here was to evaluate the motility and viability of stallion frozen semen from national breed criopreserved with dimetil-formamida 5% as cryoprotectant and posterior dilution to 2,5 and 1,25% of cryoprotectant. After thawed the samples were diluted in two final concentrations (2,5 and 1,25%) of cryoprotectant with two commercial diluents (FR4[®] e Botucrio[®]) in two moments: initial (Ti) and final (Tf). 13 distinct ejaculates from five stallions of national breed were analysed. Motility was observed using a computer assistant system analysis and viability using fluorescent probes. A significant ($P < 0,05$) increase on total and progressive motility parameters was observed at the final time, using Botu-Crio[®] comparing FR4[®]. Statistical difference ($P > 0,05$) on membrane integrity between treatments was not observed.

Keywords: equine , diluent , cryoprotectant, freezing , thawed

1. INTRODUÇÃO

Uma vez notório o interesse comercial pelo uso da técnica de inseminação artificial (IA) com sêmen congelado, pesquisas na área de criopreservação de sêmen eqüino tem sido constantemente implementadas e desenvolvidas, embora seus resultados sejam ainda pouco satisfatórios em relação aos índices de fertilidade.

Além do melhoramento genético, a congelação de sêmen serve como banco de reserva genética para animais de alto padrão racial e comercial, propicia maior intercâmbio entre criatórios das mais variadas regiões e países e seleciona indivíduos e linhagens quanto à sua fertilidade e congelabilidade. A criopreservação contribui para minimizar perdas econômicas advindas da morte de reprodutores de alto valor comercial ou que participem de programas de revitalização de raças, para a preservação contra a extinção de raças nativas e conservação de espécies ameaçadas, e ainda, para superar aspectos de infertilidade masculina em humanos (WATSON, 2000).

A criopreservação de sêmen eqüino, bem como de várias outras espécies, ainda não atingiu uma padronização de técnica que proporcione resultados satisfatórios e repetitivos, como ocorre na espécie bovina (WATSON, 2000). A maioria das pesquisas é realizada com propósito ao aprimoramento da técnica de criopreservação, tendo em vista a obtenção de resultados mais consistentes. Não houve seleção de garanhões quanto à fertilidade ou mesmo quanto à congelabilidade, o que favoreceu a permanência de grande número de garanhões com baixa fertilidade.

Torna-se necessário o uso de agentes crioprotetores no processo de congelação de sêmen para manutenção da viabilidade das células espermáticas, pois eles protegem tais células dos danos causados pelo choque térmico, devido à formação de cristais de

gelo, desidratação e posterior descongelamento (SNOECK, 2002). No entanto, esses agentes também causam efeitos tóxicos deletérios às células espermáticas quando adicionados ou retirados às mesmas (BALL & VOSS, 2001).

Este trabalho objetivou avaliar *in vitro* os efeitos da diluição do crioprotetor pós-descongelamento para concentrações de 2,5 e 1,25% mediante utilização de dois diluentes comerciais sobre o sêmen de equinos criopreservado com diluente contendo o crioprotetor dimetilformamida a 5%.

2. JUSTIFICATIVA

Durante a década passada, testemunhamos uma explosão de avanços biotecnológicos na área da reprodução animal. Algumas dessas tecnologias foram incorporadas rotineiramente na “indústria do cavalo”, outras estão sendo mais lentamente ou algumas nunca o serão. O ritmo com que estas tecnologias são aceitas e utilizadas na indústria de reprodução equina é dependente do seu sucesso, da atitude e do trabalho dos profissionais da área e, sobretudo, da relação de custo/benefício. O número de éguas inseminadas com sêmen congelado vem aumentando, particularmente nos EUA, o que impulsiona os estudos relacionados à congelamento de sêmen e atrai maiores investimentos para a área (SQUIRES, 2005).

Desde a década passada, algumas associações de criadores de cavalos, como a do cavalo Árabe, do Quarto-de-Milha, da American Paint Horse, do Brasileiro de Hipismo, entre outras, já permitem a utilização do sêmen congelado. A partir deste ano as associações de cavalos Mangalarga Marchador e Campolina, resolveram permitir a

utilização da técnica e com isso, tem-se uma abertura do mercado nacional para a congelação de sêmen eqüino.

A maior limitação ao uso do sêmen congelado na espécie eqüina, decorre da grande variabilidade individual na congelabilidade espermática devido a fatores genéticos e ambientais. Grande parte dos garanhões possui características peculiares de sêmen pós-descongelação (motilidade espermática e integridade de membrana celular) inadequadas para o seu uso (SQUIRES *et al.*, 1999), havendo até denominação específica comum: “bad freezers” e “good freezers”, para os animais que congelam mal e bem, respectivamente. O sêmen dos garanhões bons congeladores proporcionam médias de motilidade espermática progressiva pós-descongelação entre 40-70% e taxas de fertilidade entre 60-75% por ciclo, em éguas inseminadas com 300×10^6 espermatozóides, 24 horas antes e seis horas pós-ovulação. Em se tratando de garanhões maus congeladores, esse número diminui para menos de 30% na taxa de concepção por ciclo (CRISTIANELLI *et al.*, 1984; HAARD & HAARD, 1991; JASKO *et al.*, 1992; THOMASSEN, 1993; BOYLE, 1999).

Muitos estudos focaram-se na identificação dos danos causados aos espermatozóides durante o processo de congelação e descongelação. Parece haver duas classes maiores de danos espermáticos: o oxidativo e o osmótico. SQUIRES (2005), concluiu que a maioria do progresso em aumentar a sobrevivência dos espermatozóides congelados e descongelados está centrada em minimizar o estresse oxidativo e diminuir o estresse osmótico. Um dos fatores que pode estar envolvido na variabilidade da resposta pós-descongelação do sêmen eqüino é o uso do glicerol como agente crioprotetor (DEMICK *et al.*, 1976).

Quanto maiores as taxas de fertilidade utilizando protocolos mais simples de IA, maior será a credibilidade da técnica e certamente o seu uso tornar-se-à mais constante. Com isso, a rotina de inseminações com sêmen congelado em centrais de reprodução eqüina e mesmo em haras tende a um aumento, minimizando perdas com transporte de sêmen (feito atualmente com o sêmen resfriado), reduzindo o número de coletas de garanhões que são exageradamente utilizados para venda de sêmen (o que traz inúmeros benefícios do ponto de vista do bem-estar do animal) e certamente ganho genético.

Segundo WATSON (2000), o processo de criopreservação de sêmen resulta em diminuição da fertilidade quando comparado ao sêmen a fresco e por isso, deve-se ter em mente a busca para aumentar a taxa de fertilidade não se focando apenas nos protocolos de congelação, mas também em protocolos que permitam maior habilidade funcional da população de espermatozóides que sobreviveram a todo o processo de congelação/descongelação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Constituição da membrana plasmática

Segundo FLESCH & GADELLA (2000), embora exista uma considerável variação entre as diferentes espécies de mamíferos, a membrana plasmática é constituída por aproximadamente 70% de fosfolipídeos (fosfocolina glicerídeo – PC, fosfoetanolamina glicerídeo – PE, fosfatidilserina – PS, fosfatidilinositol – PI e cardiolipina – CL), 25% de lipídeos neutros (colesterol - fator mais variável entre ejaculados de um mesmo indivíduo e entre indivíduos e espécies - desmosterol, sulfato de colesterol e ésteres de colesterol) e 5% de glicolipídeos (seminolipídeos).

As diferenças na quantidade de colesterol da membrana plasmática podem não estar apenas relacionadas com índices de capacitação, podendo também afetar a fertilidade e a capacidade do ejaculado de um garanhão de suportar o resfriamento e congelamento (YANAGUIMACHI et al., 1994). MINELLI et al. (1998), relataram que o plasma seminal pode bloquear o efluxo de colesterol da membrana plasmática através de prostassomas que são vesículas prostáticas ricas em colesterol. A fluidez da membrana depende da temperatura, do seu conteúdo de colesterol e de sua composição lipídica, sendo importante o comprimento e o grau de insaturação das cadeias de ácidos graxos.

É interessante para os andrologistas, o fato de que o resfriamento de sêmen para congelamento pode levar às transições de fase, bem como de feixes de proteínas (DE LEEUW, 1990). A fase de transição se dá por uma re-organização das cadeias hidrocarbonadas, que de estado fluido e desordenado passam para o estado gel, que é o de organização mais acentuada. Tal fase ocorre em função de mudanças na temperatura (STRYER, 1992). Para a célula espermática equina, a fase de transição ocorre a uma temperatura de 20,7°C (AMMAN & GRAHAM, 1993).

Trabalhos sobre congelamento de sêmen humano concluíram que a fluidez da membrana diminui após a criopreservação e a resistência aos processos da congelamento e descongelamento é melhor em indivíduos que possuem alta fluidez de membrana. A variação desta fluidez pode justificar a variabilidade na congelamento espermática, fato que é observado individualmente entre garanhões (GIRAUD et al., 2000).

Devido à grande quantidade de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática, os espermatozoides dos mamíferos são altamente sensíveis ao estresse oxidativo. O processamento do sêmen envolve numerosos fatores que provocam danos à membrana plasmática dos espermatozoides incluindo a coleta do sêmen, a adição de

diluidores de sêmen, a centrifugação, o resfriamento, a congelação e descongelação (AURICH, 2005).

Quando comparado às outras espécies, como exemplo a ovina, a membrana plasmática dos espermatozóides dos eqüinos possui maior conteúdo de colesterol estimado em 37%. No entanto, esse conteúdo não se difere somente entre as espécies, mas também entre os indivíduos de uma mesma espécie e mesmo entre os ejaculados de um mesmo indivíduo (GADELLA et al., 2001).

3.2 Capacitação espermática

É bem possível que o tempo requerido para otimizar a capacitação espermática esteja relacionado ao lento efluxo do colesterol de sub-populações não responsivas de células espermáticas. Suporte dessa idéia é o fato de que espécies com grandes quantidades de colesterol como os humanos e os bovinos, necessitam de períodos maiores para melhor capacitação (respectivamente seis e oito horas), enquanto javalis e carneiros, que possuem pequena quantidade de conteúdo de colesterol, necessitem de apenas uma ou duas horas para a capacitação (YANAGUIMACHI et al., 1994).

São encontradas prostassomas (vesículas ricas em colesterol secretadas pela próstata) no plasma seminal de humanos e garanhões. Essas prostassomas bloqueiam o efluxo de colesterol das células espermáticas e provavelmente servem para retardar a capacitação (CROSS, 1998).

Mudanças fisiológicas na membrana plasmática após a ejaculação são essenciais para o processo de capacitação e estão associados com a ativação da capacidade

fertilizante das células espermáticas e levam também a um modelo diferente de motilidade chamada de hipermotilidade (YANAGUIMACHI et al., 1994).

Danos à membrana plasmática dos espermatozóides resultam em perda irreversível da motilidade e/ou da capacidade de fertilização. Durante a ejaculação e no trato genital feminino os espermatozóides são submetidos a inúmeros fatores que podem causar danos na sua membrana plasmática ou induzirem à morte celular. Por isso somente centenas a milhares de células, das bilhões que foram ejaculadas, irão alcançar o oviduto (MORRIS et al., 2000).

3.3 Congelabilidade

Durante a resfriamento e congelamento do sêmen, os espermatozóides sofrem uma série de mudanças físicas e químicas que incluem: a desidratação parcial, a penetração dos crioprotetores na célula, a reorganização estrutural dos lipídios e proteínas da membrana, a exposição às altas concentrações de soluto e a exposição inter e intracelular de cristais de gelo (HENRY et al., 2002; SNOECK, 2002). Os protocolos de criopreservação são feitos para minimizar tais efeitos negativos de estresse.

Segundo PICKETT (1986), a lesão celular é causada pela formação de cristais de gelo intracelular que afetam a estrutura da célula, pela concentração do soluto resultante da congelamento da água pura e da interação entre esses dois fatores. No espermatozóide equino, esses fatores são minimizados pelo controle da taxa de resfriamento entre temperaturas críticas (19°C e 8°C) e pela adição de um diluidor contendo lipídios, como a gema de ovo ou lipoproteínas, como o leite. O ponto de congelamento do citoplasma celular está normalmente abaixo de -1°C, permanecendo as células em geral não

congeladas na faixa entre -10°C a -15°C , ou seja, encontram-se resfriadas mesmo na presença do gelo. Isso indica que a membrana plasmática pode prevenir a propagação do gelo extracelular para o interior da célula super-resfriada (ZÚCCARI, 1998).

Na descongelação as células são expostas aos mesmos fatores, mas de forma contrária: rehidratação celular pela entrada de água na célula passando pela membrana plasmática para balancear a osmolaridade, que é criada quando os cristais extracelulares são derretidos. Os lipídios e proteínas da membrana plasmática são reorganizados e o crioprotetor é difundido para fora das células (PICKETT, 1986). Os espermatozóides são sensíveis a muitos fatores ambientais, incluindo temperatura, luminosidade, danos físicos e outros químicos. O choque ou mesmo as pequenas variações de temperatura causam desarranjo nos lipídios estruturais na membrana plasmática e com isso, lesão aos espermatozóides (PICKETT, 1992).

Há grande perda na viabilidade das células espermáticas no momento pós-descongelação e subletal disfunção em uma proporção da subpopulação sobrevivente. As perdas ocorridas no processo de criopreservação são compensadas com a inseminação de um grande número de espermatozóides, sendo verdadeiro tanto para sêmen de touros como para as outras espécies (WATSON, 2000). Estima-se que apenas 30-40% dos garanhões produzam sêmen de boa qualidade para o processo de congelação, e uma consistente variação na congelabilidade espermática é observada entre as espécies (ALVARENGA et al., 2003).

Muitas características dos espermatozóides são consideradas importantes para a fertilização e devem ser mantidas após a criopreservação quando se espera uma boa capacidade de fertilização: motilidade progressiva, metabolismo normal, membrana celular intacta, presença de enzimas acrossomais, proteínas de superfície responsáveis

pela interação espermatozóide-ovócito intactas e nucleoproteínas sem injúrias. Os espermatozoides criopreservados sofrem diversos estresses associados ao processo de congelação, de descongelação e de inseminação, os quais podem torná-los não viáveis. A maioria dos danos aos espermatozoides é resultante das alterações estruturais na membrana plasmática, do choque osmótico, da desidratação, da formação de cristais de gelo intracelular, das flutuações de volume/superfície celular ou desequilíbrios metabólicos (BLANCHARD et al., 2003).

3.4 Diluentes

Como forma de otimizar a qualidade do sêmen e protegê-lo, são acrescentados meios extensores ou diluidores ao sêmen após a sua coleta. Estes são pré-aquecidos a 37°C e homogeneizados, em sua maioria, junto ao sêmen na proporção de 1:1 (BLANCHARD et al., 2003).

A pressão osmótica dos extensores deve estar entre 300 e 400 mOsmol/L, sendo 350 mOsmol/L ótimo, e o pH entre 6,7 e 7,2, considerado ideal entre 6,7 e 6,9. Esses fatores contribuem para maximizar a sobrevivência dos espermatozoides, bem como sua motilidade linear (BLANCHARD et al., 2003). Ou seja, o diluente apropriado deve possuir pressão osmótica compatível com a dos espermatozoides, pH similar ao do sêmen (que está entre 6,7 a 7,2) equilibrado com os elementos minerais e contar ainda com substâncias capazes de neutralizar produtos tóxicos (antibióticos) e conferir proteção ao choque térmico (AMANN & PICKETT, 1987; BRINSKO & VARNER, 1998). Sabe-se também que a osmolaridade do fluido seminal é de aproximadamente 300 mOsmol/Kg (PICKETT et al., 1993).

Nos eqüinos comumente utilizam-se os diluentes a base de leite ou gema de ovo. A maioria contém fonte de lipoproteínas, sendo que as proteínas do leite são capazes de estabilizar elementos protéicos da membrana do espermatozóide (WATSON, 1981). HOCHACHKA (1986) observou que a caseína liga-se fortemente aos íons Ca^{++} , o que impede o acúmulo intracelular de quantidades tóxicas de Ca^{++} resultante do dano causado nas membranas. As lipoproteínas são ligadas à membrana plasmática e promovem estabilização da mesma durante o processo de congelação/descongelação.

MELO et al. (2005), observaram não existir influência dos diluentes utilizados na centrifugação nos parâmetros analisados para a congelação de sêmen eqüino, demonstrando que os diferentes diluidores a base de leite são eficientes na centrifugação dos ejaculados, no processo de congelação e indicando a importância da realização de testes individuais de congelabilidade. Foram comparadas as associações dos crioprotetores previamente à definitiva congelação e sendo esta uma possível alternativa para aumentar a fertilidade do sêmen congelado na espécie eqüina. Em outro estudo feito por MARTIN et al. (2005), foi observado que a substituição da gema de ovo integral por LDL a 8% no diluente modificado por MARTIN et al. (1979), mostrou ser benéfica para a viabilidade de espermatozóides eqüinos criopreservados.

3.5 Toxicidade dos crioprotetores à membrana plasmática

O glicerol é o mais comum agente crioprotetor utilizado nos meios de congelação de sêmen eqüino (AMMAN & PICKET, 1987), embora altere muito a permeabilidade

seletiva da membrana celular à água e aos íons, e seja tóxico aos espermatozóides em altas concentrações, prejudicando a fertilidade (GRAHAM, 1996).

HAMMERSTEDT e GRAHAM (1992) relataram outros efeitos causados pelo glicerol, que incluem: mudanças nos eventos citoplasmáticos como o aumento da viscosidade pelo glicerol intracelular, a polimerização alterada da tubulina, a alteração na associação dos microtúbulos, os efeitos no balanço bioenergético e a alteração direta na membrana plasmática e no glicocálix. Essa toxicidade é devida ao estresse osmótico, pela lenta entrada do glicerol na membrana da célula, quando comparado aos outros crioprotetores. Portanto, o glicerol possui um efeito direto na membrana plasmática, alterando a sua fluidez (GILMORE et al., 1995).

Os efeitos tóxicos do glicerol podem ser de natureza osmótica, de mudanças na organização, na fluidez e na permeabilidade da membrana, e também por injúrias bioquímicas, que ocorrem devido à interação entre este crioprotetor e os componentes dos espermatozóides (WATSON, 1995). BALL & VOSS (2001), avaliaram a tolerância osmótica do espermatozóide equino quanto à adição e remoção de diferentes agentes, concluindo que a adição e a remoção do glicerol resultaram em maior estresse osmótico, caracterizado por uma redução de motilidade e pela diminuição da integridade celular e acrossomal, quando comparado aos outros crioprotetores estudados.

3.6 Crioprotetores

A primeira prenhez em eqüinos utilizando sêmen criopreservado com o crioprotetor glicerol, foi reportada ao ano de 1957 (BARKER, 1957). Além do glicerol, outras substâncias como o etileno-glicol, dimetil-sulfóxido (DMSO) e propileno-glicol são utilizados com sucesso na congelação de embriões e vem sendo avaliados para a criopreservação de sêmen de outras espécies (JEYENDRAN, 1980).

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

ASHWOOD-SMITH (1987) classificou os crioprotetores em dois grupos: álcoois (etileno-glicol, propileno-glicol, glicerol) e amidas. Sugeriu que o crioprotetor ideal deve ter baixo peso molecular, ter boa solubilidade em água e ter mínima toxicidade aos espermatozóides. Pelo fato da maioria das amidas possuírem peso molecular menor do que o glicerol (peso molecular do glicerol é de 92, da metil-formamida 59 e da dimetil-formamida 73), esses agentes crioprotetores devem induzir menor dano osmótico por penetrarem na membrana plasmática dos espermatozóides com maior rapidez. A sensibilidade dos espermatozóides aos efeitos prejudiciais do glicerol é espécie-dependente. Para espécies como coelhos, galinhas e peixes, o glicerol tem-se mostrado ineficaz e as amidas surgem como alternativa para a congelação de sêmen nessas espécies.

Seguindo WATSON (1995), o DMSO parece ser bom crioprotetor para espermatozóides dos coelhos e elefantes e em um estudo, ele mostrou os melhores valores de motilidade e viabilidade pós-descongelação e aumentou os resultados de pós-

descongelamento de garanhões que obtiveram pobre congelamento quando criopreservados com o glicerol. Em outro experimento, CHENIER et al. (1998), relataram que não houve diferença significativa de congelabilidade entre glicerol, etileno-glicol e DMSO quando os dados de todos os garanhões foram analisados, embora o DMSO tenha melhorado características pós-descongelamento, quando comparadas aos outros tratamentos. Comparado ao glicerol e ao DMSO, o etileno-glicol apresentou capacidade de diminuir a motilidade progressiva pós-descongelamento dos espermatozoides equinos. No mesmo estudo, o sêmen congelado com dietileno-glicol e propileno-glicol evidenciaram baixa motilidade e viabilidade pós-descongelamento em relação aos demais agentes crioprotetores.

Segundo MELLO et al. (2005), a adição do crioprotetor em múltiplas etapas, associada ao resfriamento da amostra lentamente antes do processo de congelamento, é o tratamento mais eficaz para preservar a viabilidade das células espermáticas de equinos. Baseado nas metodologias de avaliação laboratorial e fertilidade a campo, a associação do glicerol com a dimetil-formamida mostrou ser uma alternativa para a criopreservação de espermatozoide equino (NEVES NETO et al., 2004). Em seu estudo, SILVA (2005) utilizou o crioprotetor dimetil-formamida (DMF) isolado ou em associação com glicerol e com o etileno-glicol e verificou ser o primeiro mais eficaz do que os dois últimos na criopreservação de sêmen de equinos da raça Pônei Brasileira. Curiosamente, um estudo feito por OLIVEIRA et al. (2006), concluiu que os crioprotetores utilizados no experimento foram eficientes na proteção espermática durante o processo de congelamento e descongelamento de sêmen de jumentos de raças nacionais. No entanto, apesar dos bons resultados *in vitro*, não foi observada prenhez em nenhuma jumenta inseminada com o sêmen congelado.

3.7 Amidas

As amidas demonstraram eficiência congelção de diversas espécies animais e também na eqüina. As amidas apresentaram resultados bastante favoráveis nos diversos parâmetros espermáticos avaliados, em especial para garanhões que apresentam resultados desfavoráveis com o uso do glicerol (ALVARENGA et al., 2000). De um modo geral, as amidas apresentam uma menor toxicidade ao espermatozóide quando comparadas ao glicerol (AMMAN & PICKET, 1987; GRAHAM, 1996). A eficiência das amidas pode estar relacionada ao seu menor peso molecular em relação ao glicerol, o qual confere uma maior permeabilidade na membrana plasmática e acrossomal, conseqüentemente causa menor dano osmótico aos espermatozóides (MEDEIROS et al., 2003).

Alguns experimentos demonstraram que a dimetil-formamida (DMF) preservou os espermatozóides eqüinos similarmente ao glicerol (ALVARENGA et al., 1996; KEITH, 1998), quando utilizados em garanhões com altos índices de congelabilidade. Segundo ALVARENGA et al. (2005) a menor viscosidade e o menor peso molecular das amidas favorecem uma maior permeabilidade desses componentes dentro da membrana plasmática.

VIDAMENT et al. (2002) não encontraram melhora na qualidade do sêmen eqüino criopreservado utilizando glicerol a 1%, 3% e 5% com diferentes concentrações de DMF (1% e 3%) quando comparados com o uso exclusivo do glicerol (GLY). Em um experimento similar utilizando um ejaculado de vinte garanhões de diferentes raças MEDEIROS et. al (2002), observaram que o sêmen congelado somente com DMF

resultaram numa maior motilidade ($p < 0.05$) em relação aos outros crioprotetores. Explica-se a discordância entre os dois autores: houve diferenças entre os experimentos através do número e variabilidade dos garanhões utilizados. No primeiro foram utilizados apenas cavalos que possuíam boa congelabilidade, no segundo, houve uma variedade maior de raças e com isso, grande variabilidade na qualidade do sêmen congelado que foi utilizado.

Ainda, MEDEIROS et al. (2002), demonstraram que a motilidade pós-descongelação (total e progressiva) foi maior quando os espermatozóides foram congelados em presença de 3% de dimetil-acetamida (DMA), comparado com glicerol a 5%, no entanto a motilidade foi similar na presença de 5% de DF ou 5% de metil-formamida (MF). Os resultados de motilidade total e progressiva para os diferentes tratamentos foram: DMA 3% (50% e 15%); MF 5% (49% e 10%); DMF 5% (52% e 12%); e GLY 5% (27% e 8%).

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

Em outro experimento com sêmen congelado utilizando extensor contendo lactose EDTA com DMF ou GLY, MOFFET et al. (2003), demonstraram não haver melhora na motilidade, embora as taxas de prenhez fossem maiores em éguas inseminadas com o meio diluidor contendo DMF (47%, 14/30), comparadas ao grupo com meio contendo GLY (14%, 5/34). Baseados nesses dados, concluíram que o glicerol pode reduzir as taxas de fertilidade de sêmen congelado, mesmo que a motilidade e viabilidade dos espermatozóides estejam preservadas.

Em contraste, VIDAMENT et al. (2002), não mostraram diferenças nas taxas de fertilidade em éguas inseminadas com sêmen que foram congelados com diluidores contendo DMF ou GLY; as éguas eram inseminadas diariamente e as taxas de prenhez para as inseminadas com sêmen congelado contendo 2% GLY ou 2% DMF foram 46 e 50%, respectivamente.

Em estudos com coelhos, demonstrou-se que o uso da dimetil-formamida preserva melhor a motilidade espermática pós-descongelação, quando comparada ao glicerol (HANADA & NAGASE, 1980); no entanto, WILMUT & POLGE (1977) observaram que a dimetil-formamida promoveu uma menor motilidade espermática após a descongelação de sêmen de humanos e ovinos.

3.8 Avaliações laboratoriais

Sobre a determinação da integridade de membrana, muitas tentativas basearam-se na idéia de que uma membrana plasmática intacta poderia prevenir a morte das células espermáticas, por não penetrarem substâncias do meio externo em seu citoplasma. Isto foi primeiramente estudado através das colorações de eosina ou eosina combinada com nigrosina (DOTT & FOSTER, 1972).

Nas avaliações de rotina ou nos espermogramas de sêmen a fresco observa-se: a motilidade espermática, a morfologia, a integridade de membrana, o número de espermatozoides por ejaculado e o volume e coloração do ejaculado. No entanto essas características não foram ainda significativamente correlacionadas com a fertilidade dos garanhões (NEILD et al., 1999; TORRES-BOGGINO et al., 1994), mas servem de parâmetro por constarem nos padrões estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal – CBRA (1998) para as características espermáticas de eqüinos.

Atualmente colorações fluorescentes, como por exemplo, o iodeto de propídio (PI), o acetato de carboxi-fluoresceína (CFDA) ou o SYBR-14, são usados com êxito para avaliação do sêmen eqüino (HARKEMA & BOYLE, 1992; HARRISON & VICKERS, 1990). Os corantes fluorescentes com afinidade para o DNA não são permeáveis às células intactas e por isso, somente as células mortas serão coradas em vermelho, enquanto as células intactas coram-se em verde. Fazem parte do grupo de sondas fluorescentes o brometo de etídio, o iodeto de propídio e o hidroetidine, entre outros (ZÚCCARI, 1998). HARRISON & VICKERS (1990) acrescentaram à técnica, o formaldeído para que as células ficassem estáticas, sem sofrer danos estruturais. A partir desse método, tornou-se possível a avaliação de preparações úmidas para microscopia de epifluorescência, sendo alternativa mais economicamente viável do que a citometria de fluxo.

A maioria dos estudos sobre integridade funcional da membrana plasmática ainda utiliza a motilidade dos espermatozoides como seu maior marcador. Apesar da relevância da integridade de membrana para a motilidade espermática, esta depende da produção energética originária do compartimento mitocondrial da peça intermediária do espermatozoide (BRITO et al., 2003). A limitação da avaliação subjetiva da motilidade espermática pela microscopia óptica e de contraste de fase, está sendo substituída pelo uso da análise espermática assistida por computador (CASA – computer assisted systems analyzed). Existem diferentes sistemas e fabricantes do CASA e ele não somente permite determinar a percentagem de espermatozoides móveis e imóveis, como também caracteriza o padrão de motilidade da célula espermática de humanos, touros, garanhões, cães, ovinos e animais de laboratório (VERSTEGEN et al., 2002). Combinações de diferentes padrões de velocidade permitem a definição de diferentes subpopulações espermáticas e tendem a correlacionarem-se melhor com a fertilidade do que ser apenas um simples parâmetro de velocidade (ABAIGAR et al., 1999). A análise espermática obtida através do CASA permite uma determinação de variados parâmetros para a motilidade e de uma avaliação de aberrações morfológicas (THURSTON et al., 1999).

Assim, cada sistema de análise computadorizada precisa de uma padronização na preparação da amostra de sêmen, calibração da máquina e eficiência técnica para a obtenção de resultados acurados e com repetibilidade (SCHÄFER-SOMI & AURICH, 2006). Alguns autores chamam atenção sobre a habilidade do CASA em predizer sobre a fertilidade individual dos garanhões, uma vez que seus dados devem ser correlacionados com estudos de fertilidade *in vivo* (VIZCARRA & FORD, 2006). Segundo VERSTEGEN et al. (2002), o maior problema relacionado ao CASA é a padronização e otimização do equipamento e de seus procedimentos por seus operantes; embora relate que todos os diferentes equipamentos de análise computadorizada têm demonstrado altos

níveis de precisão e de resultados confiáveis, por ser uma grande ferramenta fornecedora de comparações objetivas da motilidade com a morfologia espermática.

Entretanto, para fins de pesquisa científica, o sistema de análise computadorizada de espermatozóides torna-se uma ferramenta de grande valia por proporcionar uma confiável avaliação dos movimentos dos espermatozóides.

3.9 Sêmen congelado e ambiente uterino, implicações

Quando o número de espermatozóides ou a sua qualidade na inseminação está reduzido, a fertilidade declina em uma curva exponencial. Normalmente a inseminação é feita com um número suficiente de espermatozóides competentes para se alcançar melhores resultados. Se o número total de espermatozóides viáveis em uma inseminação com sêmen congelado cair abaixo do número que se precisa para uma boa taxa de fertilização, então a fertilidade será reduzida (HUNTER, 1984).

LOOMIS (2001) observou que a fertilidade do sêmen congelado em programas comerciais oscilou entre 32 - 73% em éguas, inseminadas uma única vez e 56 – 89% em éguas inseminadas mais de uma vez durante a estação de monta, constatando que a fertilidade do sêmen congelado é influenciada por inúmeros fatores, incluindo: a qualidade espermática, a seleção do garanhão, a dose inseminante, a seleção da matriz e o manejo da mesma.

Para o sucesso da inseminação com sêmen congelado, além do mesmo estar com bons padrões pós-descongelamento, é essencial que se tenha um histórico reprodutivo das éguas que serão utilizadas, que se realize o acompanhamento folicular diário e que se

utilize a melhor técnica para a deposição do sêmen no ambiente uterino. As fêmeas com idade acima de oito anos e com histórico de problemas reprodutivos têm, em geral, baixas taxas de prenhez e são candidatas em potencial a não conceberem (SAMPER et al., 2001). As endometrites persistentes pós-inseminação, a acumulação de líquidos ou a ocorrência de edema uterino podem reduzir seriamente as chances de prenhez nas fêmeas (TROEDSSON et al., 1995). As inflamações uterinas pós-inseminação ou endometrites agudas após utilização de sêmen congelado não são mais severas do que se feitas com sêmen fresco ou resfriado, mas parecem ser mais duradouras (METCALF, 2000) e podem variar conforme a concentração de espermatozóides depositada e o agente crioprotetor utilizado.

Segundo KOTILAINEN et al. (1994) o sêmen congelado não é induz uma maior inflamação uterina do que o sêmen a fresco, mas devido ao volume diminuído e a alta concentração espermática, a resposta uterina tende a ser mais forte do que quando utilizados outros tipos de sêmen. A grande proporção de espermatozóides mortos quando inseminadas éguas com sêmen congelado, propõe uma razão para a grande resposta inflamatória uterina, entretanto, os espermatozóides mortos não induziram um maior influxo de polimorfonucleares dentro do fluido uterino do que os espermatozóides vivos depositados no útero das éguas inseminadas com sêmen a fresco (KATILA, 1997).

Em um estudo LOOMIS & SQUIRES (2005) observaram presença de fluido uterino pós-inseminação em 23% das éguas inseminadas com sêmen congelado, não observando diferença na incidência do fluido uterino em éguas inseminadas uma ou mais vezes por ciclo. A presença de fluido uterino pós-inseminação está associada a um efeito negativo nas taxas de fertilidade e diminuição nas taxas de concepção (BARBACINI et al., 2003).

O melhor momento da inseminação na égua com sêmen congelado está entre seis horas antes ou pós-ovulação (SAMPER & MORRIS, 1998) sendo que, durante muitos anos, as inseminações eram feitas depositando-se o sêmen no corpo do útero. MORRIS et al.(2000) no entanto, demonstraram percentuais de 64, 75 e 60% de prenhez em éguas inseminadas com 1, 5 ou 10 milhões de espermatozóides do mesmo garanhão, na junção útero-tubárica. Parece que a deposição do sêmen no corno uterino ou próximo a essa junção, maximiza o potencial espermático, aumentando o número de espermatozóides no oviduto, além de poder atuar no aumento das taxas de prenhez em éguas inseminadas com sêmen congelado (SAMPER, 2001).

4. Raças nativas e sua preservação

Nos últimos anos tem-se notado em âmbito mundial uma crescente preocupação com a conservação e a preservação de raças nativas, em virtude da sua extinção através de cruzamentos absorventes com outras raças. Dados da FAO (2000) relatam existir cerca de 40 espécies de animais domésticos (búfalos, cabras, cavalos, bois, etc.), compreendendo entre 4500 e 5000 raças e tipos de animais locais. Destas raças, aproximadamente 28% estão em risco de extinção, sendo que cerca da metade é pertencente a países em desenvolvimento. Segundo REGE & GIBSON (2003), das raças nativas existentes hoje, 70% encontram-se em países em desenvolvimento.

A conservação dos recursos genéticos animais tornou-se uma necessidade premente devido à grande perda desses recursos em todo o mundo, pois a sua exploração sem critério e a degradação do meio ambiente imposta pelo homem encontra-se disseminada em várias regiões. Diferentes recursos genéticos animais possuem não

apenas valor socioeconômico, mas também valores étnicos e culturais, inclusive por participarem de rituais em algumas seitas e religiões (SANTOS et al., 2003).

No Brasil, pode-se dizer que as raças nativas hoje existentes são descendentes de raças de animais que foram inicialmente trazidos da Europa pelos colonizadores, sendo em sua maioria de origem Ibérica. Podem ser citadas a raça Campolina, Mangalarga Marchador, Campeira e Pantaneira como descendentes de cavalos espanhóis. Entretanto, devido às diferenças geoclimáticas nas regiões de criação e ao propósito da criação pelos proprietários dos animais, surgiram raças que podem ser chamadas de nativas e que possuem características próprias.

Em relação às raças nativas duas podem ser consideradas vulneráveis ou em ameaça de extinção: a raça Pantaneira e a raça Campeira, respectivamente. Ao longo dos anos, a raça Pantaneira desenvolveu características adaptativas às condições edafoclimáticas da região Pantanal, através da seleção natural (SANTOS et al., 1995) e só não chegou a ser extinta devido ao esforço de alguns criadores e pessoas interessadas pela raça que se mobilizaram e fundaram a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Pantaneiros (ABCCP), em 1972. Essa associação conta atualmente, com aproximadamente, 2600 fêmeas e 500 machos registrados (dados fornecido pela ABCCP, 2003).

No entanto, a criação do cavalo Campeiro que era antes abundante em toda a região do Planalto Catarinense, Planalto do Rio Grande do Sul e Campos Gerais do Paraná (Região dos Pinhais), restringe-se atualmente entre as cidades de Lages e Curitiba, ambas situadas no Planalto Catarinense (Dados fornecidos pela Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Campeiro - ABRACCCa, 1984). Foi observado um total de, aproximadamente, 120 animais Campeiros registrados no ano de 1985,

enquanto no ano de 1998, esse número caiu para menos de 20 animais registrados junto à associação. Esses dados revelam que os números são preocupantes e que a raça caminha para um processo de extinção (MC. MANUS et al., 2005).

5. OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* os efeitos da redução na concentração do crioprotetor pós-descongelamento mediante o uso de dois diluentes comerciais no sêmen de eqüinos criopreservado com diluente contendo o crioprotetor dimetilformamida.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os parâmetros espermáticos de motilidade e viabilidade após a diluição do crioprotetor dimetilformamida a 5% para 2,5 e 1,25% de concentração em ganhões de raças nacionais utilizando dois diluentes comerciais, bem como analisar o efeito entre as diluições e os diluentes.

6. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ABAIGAR, T. et al. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*gazelle dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biology Reproduction**. v.60, p. 32-41, 1999.

ABRACCCa, Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos Campeiros. Campeiro, o marchador das araucárias. **Curitibanos: Panfleto**, 6p., 1984.

- ALVARENGA, M.A. et al. The effect of breed and spermatic parameters over equine sêmen freezability. In: SYMPOSIUM ON STALLION SEMEN, 1996, Amersfort, **Anais...**; Amersfort, p.82, 1996.
- ALVARENGA, M.A., et al. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. In: 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 2000. **Proceedings** Stockholm, p.157, 2000.
- ALVARENGA, M.A. et al. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion sêmen. In: Workshop on Transporting Gametes and Embryos, Havemeyer Foundation, 2003. **Proceedings**, p.74-76, 2003.
- ALVARENGA, M.A. et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **An. Reprod. Sci.**, n.89, p.105-113, 2005.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKinnon, AO, Voss JL. **Equine reproduction. Pennsylvania: Lea & Febiger**, cap80, p.715-45, 1993.
- AMANN, R.P.; PICKET, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equ. Vet. Sci.**, v.7, p.145-173, 1987.
- ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K. FULLER, B.J. (Eds.), **Temperature and Animal Cells**. Cambridge, UK, Biologists Ltd. p.395-406, 1987.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v.89, Issues 1-4, p. 65-75, 2005.

- BALL, B.A., VOSS, A. Osmotic tolerance on equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **J. Andrology**, v.22(6), p.1061-9, 2001.
- BARBACINI, S. et al. Retrospective study of the incidence of post-insemination uterine fluid in mares with frozen-thawed semen. **J. Equine Vet. Sci.** n.23, p. 493-496, 2003.
- BARKER C.A.V., GANDIER, J.C. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididimal spermatozoa. **Can J Comp Med Vet Sci**, v.21, p.47-51, 1957.
- BLANCHARD, T.L. et al. **Manual of equine reproduction**. Mosby, 2nd ed, 2003.
- BOYLE, M.S. Assessing the potential fertility of frozen stallion semen. In: Allen WR and Wade JF (eds.), **Havemeyer Foundation Monography series** no. 1. R&W Publications Ltd, Newmarket, p.13-16, 1999.
- BRINSKO, S.P., VARNER, D.D. Artificial insemination and preservation of semen. In: BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D. Stallion management. **Vet. Clin. North America: Equine Practice**, v.8, n.1, p.205-218, 1992.
- BRITO, L.F.C. et al. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.
- CHENIER, T. et al. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. Proceedings for Annual Meeting, Society for Theriogenology. **Anais...**, p.52-53, 1998.

- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual de exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2ed.; Belo Horizonte, CBRA, 1998, 49p.
- CRISTANELLI, M.J. et al. Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. **Theriogenology**, v.22, p.39-45, 1984.
- CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation, **Biol. Reprod.**, n.59, p. 7-11, 1998.
- DE LEEUW, F.E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, n.27, p. 171-183, 1990.
- DEMICK, D.S. et al. Effect of cooling, storage with glycerolization and spermatozoa number on equine fertility. **J. Anim. Sci.**, v.43, p.633-637, 1976.
- DOTT, H.M., FOSTER, G.C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live and dead stain. **J. Reprod. Fertil.**, v.29, p. 443-446, 1972.
- FAO. World watch list for domestic animal diversity. **Editado por B.D.Scherf**, 3a. ed, 744p., Rome, 2000.
- FLESCH, F.M., GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization, **Biochemica et Biophysica Acta**, n.1469, p.197-235, 2000.
- GADELLA, B.M. et al. Capacitation and the acrossome reaction in equine sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, v.68, p.249-265, 2001.

- GILMORE, J.A. et al. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biol. Reprod.**, n.53, p.985-995, 1995.
- GIRAUD, M.N. et al. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v.15, p.2160-2164, 2000.
- GOMES, G.M. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-9, 2002.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinical of North American: Equine Practice**, v.12, p.131-147, 1996.
- HANADA, A., NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v.60, p.247-252, 1980.
- HAARD, M.C.; HAARD, M.G.H. Successful commercial of frozen stallion semen abroad. **J Reprod Fertil** (Suppl.), n.44, p.647-648, 1991.
- HAMMERSTEDT, R.H., GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, n.29, p.26-38, 1992.
- HARKEMA, W., BOYLE, M.S. Use of fluorescent stains to assess integrity of equine spermatozoa. **Proc. 12th International Congress on Animal Reproduction**, v.03, p.1424-1426, 1992.
- HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v.88, p.343-352, 1990.
- HENRY, M. et al. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. **Theriogenology**, n.58, p.245-248, 2002.

- HOCHACHKA, P.W. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. **Science**, v.231, p.234-241, 1986.
- HUNTER, R.H.F. Pre ovulatory arrest and periovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. **J. Reprod. Fertil.**, n.72, pgs. 203-211, 1984.
- JASKO, D.J. et al. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. In: 38th Ann. Conv. AAEP. **Proceedings**, p.649-660, 1992.
- JEYENDRAN, R.S., GRAHAM, E.F. An evaluation of crioprotective compounds on bovine spermatozoa. **Cryobiology**, v. 17, p.458-464, 1980.
- KATILA, T. Neutrophils in uterine fluid after insemination with fresh live spermatozoa or with killed spermatozoa. **Pferdeheilkunde**, n. 13, p.54, 1997.
- KEITH, S.L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine semen**. 1998, Master Thesis, Colorado State University, Colorado.
- KOTILAINEN, T. et al. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, n.41, p.629-636, 1994.
- LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Anim. Reprod. Sci.**, v.68, p.191-200, 2001.
- LOOMIS, P.R, SQUIRES, E.L. Frozen sêmen management in equine breeding programs. Capturado em 25 jun. 2005. Disponível na Internet. <http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/the>.

- MARTIN, C.E.G. et al. Viabilidade de espermatozóide eqüinos criopreservados em diluente contendo lipoproteína de baixa densidade. In: Congr. Bras. de Reprod. Animal. **Anais...**, v.16, p.227, Goiânia, GO, 2005. (Resumos)
- MARTIN, J.C. et al. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straw. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n.27, p.47-51, 1979.
- MC. MANUS et al. Caracterização morfológica de eqüinos da raça Campeiro. **Ver. Bras. Zootec.**, v.34, n.5. p.1553-1562, 2005.
- MEDEIROS, A.S.L. et al. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, n.58, p.273-276, 2002.
- MEDEIROS, A.S.L. et al. Avaliação da integridade acrossomal de espermatozóides de garanhões criopreservados com crioprotetores a base de amidas e glicerol. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, n.3, p. 353-354, 2003.
- MELLO, F.G. et al. Efeitos da adição fracionada da dimetil-formamida ao meio diluidor e duas curvas de resfriamento na preservação da viabilidade de espermatozóide eqüinos congelados. In: Congr. Bras. de Reprod. Animal. **Anais...**, v.16, p.268, Goiânia, GO, 2005. (Resumos)
- MELO, C.M. et al. Efeito de diferentes diluentes de centrifugação e crioprotetores na congelação de sêmen eqüino. In: Congr. Bras. de Reprod. Animal. **Anais...**, v.16, p.185, Goiânia, GO, 2005. (Resumos)
- METCALF, E.L. The effect of post-insemination endometritis on fertility of frozen stallion semen. In: 46th Ann. Conv. AAEP. **Proceedings**. p.332-400, 2000.

- MINELLI, A. et al. Occurrence of prostasome-like membrane vesicles in equine seminal plasma. **J Reprod Fertil**, v.2, n.114, p.237-243, 1998.
- MOFFET, P.D. et al. Comparison of dimethyl-formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. Proc. Soc. For Theriogenology Ann. Conf. **Abstract...**, p.42, 2003.
- MORRIS, L.H.A. et al. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **J. Reprod. Fertil.** , v. 118, p.95-100, 2000.
- NEILD, D.M., et al. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia**, n.32, p.351-355, 1999.
- NEVES NETO, J.R. et al. Avaliação estrutural e funcional da célula espermática equina frente a diferentes substâncias crioprotetoras. Sociedade Brasileira de Transferência de Embrião. **Acta Scientia Veterinariae**, n. 32 (Supl.), p.175, 2004.
- OLIVEIRA, J.V. et al. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. **Anim. Reprod. Sci.** n. 94, p. 82-84, 2006.
- PICKETT, B.W., AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger (ed.), p.769-789, 1993.
- PICKETT, B.W. Pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen-thawed stallion semen. In: 38th Ann. Conv. AAEP. **Proceedings**. p.649-660, 1992.

- PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation. In: TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS. **Proceedings...**, Fort Collins: Colorado State University, p.1-5, 1998.
- REGE, J.E.O., GIBSON, J.P. Animal genetic resources and economic development: issues in relation to economic valuation. **Ecological Economics**, v.45, p.319-330, 2003.
- SAMPER, J.C., MORRIS, C.A. Current methodology for stallion semen cryopreservation: an international survey. **Theriogenology**, v.49, p. 895-904, 1998.
- SAMPER, J.C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Anim. Reprod., Sci.**, v.68, p. 219-228, 2001.
- SANTOS, S.A. et al. Avaliação e conservação do cavalo Pantaneiro. **Corumbá:EMBRAPA- CPAC**, circular técnica n.21, 40p., 1995.
- SANTOS, S.A. et al. Estratégias de Conservação *in situ* do Cavalo Pantaneiro. **Corumbá:EMBRAPA Pantanal**, ISSN 1517-1973, n.55, 30p., 2003.
- SCHÄFER-SOMI, S., AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. **Anim. Reprod. Sci.**, doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.03.019, 2006.
- SILVA, J.A.B. et al. Criopreservação de sêmen equino utilizando diferentes crioprotetores. Tese (mestrado) – Curso de Pós-graduação FAV-UNB, Brasília, DF, 2005.
- SNOECK, P.P.N. et al. Efeito de três temperaturas de descongelamento sobre os espermatozoides equinos congelados com diferentes agentes crioprotetores. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.26, n.3, p.454-5, 2002

- SQUIRES, E.L. et al. Cooled and frozen Stallion Semen. **Fort Collins:animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, 1999. (Apostila).
- SQUIRES, E.L. Integration of future biotechnologies into the equine industry. **Ani. Reprod. Sci.**, v. 89, Issues 1-4, p.187-198, oct.2005.
- STRYER, L. **Introdução ao estudo das membranas biológicas**. In: __. Bioquímica. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,, cap. 12, p. 230-56, 1992.
- THOMASSEN, R. Insemination with stallion semen frozen in 0.5 ml straws. **Reprod. Dom. Anim.** v.28, p.289-293, 1993.
- THURSTON, L.M., et al., Sources of variation in the morphological characteristics of sperm sub-populations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. **J. Reprod. Fert.**, n.117, p. 271-280, 1999.
- TORRES-BOGGINO, F., et al. Relationship among seminal characteristics, fertility and suitability for semen preservation in draft stallions. **J. Vet. Med. Sci.**, n,57, p.225-229, 1994.
- TROEDSSON, M.H.T. et al. Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. **Biol. Reprod. Suppl.**, v.52, p.307, 1995.
- VERSTEGEN, J. et al. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, n.57, v.1, p.149-179, 2002.
- VIDAMENT, M.et al. Motility and fertility of stallion sêmen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, n.58, p.1-3, 2002.
- VIZCARRA, J.A., FORD,J.J. Validation of the sperm mobility assay in boars and stallions. **Theriogenology**, n.66, p.1091-1097, 2006.

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

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their post-thawing function. **Reprod. Fert. Dev.**, v.7, p.871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved sêmen. **An. Reprod. Sci.** n.60-61, pgs.481-492, 2000.

WILMUT I., POLGE, C. The low temperatures preservation of boar spermatozoa frozen and thawed in the presence of permeating agents. **Cryobiology**, v.14, p.471-8, 1977.

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

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Tese (doutorado) – Curso de Pós-graduação em Reprodução Animal, da FMVZ – UNESP, Botucatu, SP, 1998.

7. CAPÍTULO ÚNICO

Efeito da diluição do crioprotetor dimetilformamida de amostras de sêmen eqüino descongeladas utilizando-se dois diferentes diluentes comerciais

Dilution effect of dimetilformamíde cryoprotectant from post thawed equine semen samples using two different commercial diluents

Marina Ferreira Zimmermann; Adalberto Farinasso, Cely Marini Melo, Frederico Ozanam Papa, Jairo Pereira Neves

Trabalho enviado à revista Ciência Rural da Universidade de Santa Maria, RS.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar parâmetros de motilidade e viabilidade in vitro na diluição do crioprotetor dimetilformamida a 5% pós-descongelção para concentrações de 2,5 e 1,25%, mediante utilização de dois diluentes comerciais adicionados junto ao sêmen de eqüino criopreservado. Após a descongelção as amostras foram diluídas com a finalidade de manter as concentrações finais (2,5 e 1,25%) de crioprotetor, utilizando-se dois diluentes comerciais (FR4[®] e Botu-Crio[®]) em dois tempos: inicial (Ti) e final (Tf). Foram utilizadas 13 amostras de

ejaculados distintos de cinco garanhões de raças nacionais. Os parâmetros de motilidade foram observados através da análise computadorizada e os de integridade de membrana plasmática pela microscopia de epifluorescência. Verificou-se melhora nos parâmetros de motilidade total e progressiva dos espermatozóides, no tempo final ($P < 0,05$) com o diluente Botu-Crio[®] em relação ao FR4[®]. Não houve diferença, $P > 0,05$, entre os tratamentos quanto à a integridade de membrana plasmática.

Palavras-chave: *equino, diluente, crioprotetor, congelação, descongelação.*

ABSTRACT

The purpose of the study reported here was to evaluate the motility and viability of stallion semen cryopreserved with dimetil-formamylde 5% as cryoprotectant and posterior dilution to 2.5 and 1.25% as final concentration of cryoprotectant. After thawed the samples were diluted with two commercial diluents (FR4[®] and Botucio[®]) in two moments: initial (Ti) and final (Tf). 13 distinct ejaculates from five stallions of national breed were analysed. Motility was observed using a computer assistant system analysis and viability using fluorescent probes. A significant ($P < 0.05$) increase on total and progressive motility parameters was observed at the final time using Botu-Crio[®] comparying FR4[®]. Statistical difference ($P > 0.05$) on membrane integrity between treatments was not observed.

Key words: *equine, diluent, cryoprotectant, freezing, thawed.*

INTRODUÇÃO

O número de éguas inseminadas com sêmen congelado vem aumentando e isso estimula e atrai maiores investimentos para a área da reprodução equina (SQUIRES,

2005). A Congelação de sêmen propicia maior intercâmbio entre os haras de várias regiões e países, seleciona indivíduos quanto à fertilidade e à congelabilidade, ainda atuando na conservação de espécies ameaçadas de extinção (WATSON, 2000).

Ocorre uma variabilidade individual na congelabilidade do sêmen devido a fatores genéticos e de ambiente. Na espécie eqüina, é grande o número de garanhões que possuem características de sêmen pós-descongelamento, motilidade e integridade de membrana, inadequadas para o seu uso (SQUIRES et al., 1999). Há casos onde a inflamação uterina pós-inseminação, endometrite aguda, parece ser mais duradoura dependendo do agente crioprotetor utilizado e do número de espermatozóides inseminados com sêmen congelado (METCALF, 2000).

A maioria dos estudos visando ao aumento da sobrevivência dos espermatozóides congelados e descongelados, buscam minimizar o estresse oxidativo e diminuir o osmótico (SQUIRES, 2005). A coleta do sêmen, a adição de diluidores, a centrifugação, a refrigeração, a congelação e a descongelação, provocam danos à membrana plasmática dos espermatozóides (AURICH, 2005).

Os espermatozóides dos eqüinos parecem suportar uma faixa entre 150-900 mOsm e quando o volume celular excede o volume lítico da célula, ocorre a ruptura da membrana plasmática resultando na perda da sua viabilidade (POMMER et al., 2002). DE LEEUW et al. (1990) sugerem que as alterações na camada fosfolipídica causadas pelos eventos de fase-separação durante o processo de criopreservação, afetam as propriedades osmóticas. Especialmente para os espermatozóides dos eqüinos cuja permeabilidade de membrana é afetada pelo choque a frio induzido pelo rápido congelamento em temperaturas próximas a zero (DEVIREDDY et al., 2002).

Segundo ALVARENGA et al. (2005) a menor viscosidade e o menor peso molecular das amidas favorecem uma maior permeabilidade desses componentes dentro da membrana plasmática. BALL & VO (2001) relataram que uma rápida remoção de crioprotetores resulta num choque hiposmótico relativo sobre a diluição em meios extensores isotônicos ou nos fluidos do trato uterino da égua. Isso se reflete na rápida perda da motilidade espermática, integridade de membrana e potencial mitocondrial da membrana (POMMER et al., 2002).

Este trabalho objetivou avaliar *in vitro* os efeitos da redução da concentração do crioprotetor dimetilformamida a 5% pós-descongelação, para 2,5 e 1,25% mediante utilização de dois diluentes comerciais em sêmen de eqüinos criopreservado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinco garanhões de raças nacionais: Pantaneira (2), Campeira (2) e Campolina (1), com idades entre 4 e 15 anos, aptos a reprodução e com boa fertilidade. O congelamento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia / CENARGEN, Fazenda Experimental Sucupira, Brasília - DF.

As coletas foram realizadas utilizando vagina artificial modelo Botucatu e filtro de nylon próprio para remoção da fração gel. Após a coleta realizou-se o exame quanto aos seguintes características: volume, aspecto, coloração, motilidade (0–100), vigor (0–5) e concentração espermática (1:20) utilizando microscópio e objetiva de 20X.

O sêmen foi diluído com extensor à base de leite desnatado (proporção de 1:1) e centrifugado a 600g/10 min. O sobrenadante foi retirado e os *pellets* ressuspensos com meio de congelamento FR4[®] (Nutricell, Campinas/SP) contendo 5% de crioprotetor

dimetil-formamida (SIGMA-ALDRICH[®]). O envase foi realizado em palhetas de 0.5mL identificadas e lacradas com álcool polivinílico e com uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL. As palhetas foram resfriadas a 5°C por 60 min. em refrigerador doméstico, em seguida congeladas em vapor de nitrogênio líquido (distribuído em uma caixa de isopor) e colocadas sobre um suporte a uma altura de 5cm acima do nível líquido do N₂ e temperatura próxima de -120°C, por 20 min. Após esse tempo, as palhetas, foram imersas no nitrogênio líquido em temperatura próxima de -196°C e armazenadas em botijão criobiológico.

As análises das amostras de sêmen foram realizadas no Laboratório de Andrologia do Departamento de Radiologia e Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP / Campus Botucatu. Foram descongeladas 13 amostras, de 13 ejaculados distintos. As palhetas foram descongeladas à temperatura de 45°C por 20 seg. sendo o sêmen armazenado em tubos de microcentrífuga previamente aquecidos a 37°C e separados em cinco alíquotas a seguir caracterizadas:

C = controle (sêmen); **1) FR50** = 50µL de sêmen + 50µL de diluidor FR4[®] / diluição de 50%; **2) BOT50** = 50µL de sêmen + 50µL de diluidor Botu-Crio[®] / diluição de 50%; **3) FR25** = FR 50 + 100µL de diluidor FR4[®] / diluição de 25%; **4) BOT25** = BOT 25 + 100µL de diluidor Botu-Crio[®] / diluição de 25%.

*Ambos diluidores, FR4[®] (Nutricell) e Botu-Crio[®] (Biotech-Botucatu-Ltda/ME, Brasil) não continham crioprotetor.

As análises iniciais foram realizadas 10 min após as diluições (tempo de estabilização) nas amostras que eram acondicionados em banho-maria a seco a 37°C. As avaliações foram realizadas através da análise computadorizada da motilidade (CASA).

As amostras foram analisadas de acordo com os seguintes parâmetros: motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), velocidade média (VAP μ m/s), velocidade progressiva (VSL μ m/s), velocidade curvilinear (VCL μ m/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH μ m), frequência de batimento flagelar (BCF Hz), quantidade de espermatozoides rápidos (RAP%), nos tempos T_i (inicial) e T_f (final, 1h após as diluições).

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática (IMP) foi utilizada a técnica de coloração descrita por ZÚCCARI (1998) contendo: solução de carboxifluoresceína (20 μ L), solução de iodeto de propídio (10 μ L), solução de formaldeído (10 μ L) e solução de citrato de sódio (0,96mL). Foi adicionado 40 μ L de cada tratamento na solução descrita e seguiam-se as avaliações em microscopia de epifluorescência analisando-se 200 céls/trat./lâmina. Os espermatozoides corados em verde foram considerados com a membrana íntegra e os corados em vermelho com membrana lesada.

Para análise estatística utilizou-se o teste de Tukey para comparação entre médias das variáveis de motilidade e integridade de membrana plasmática. O teste de Dunnet foi realizado para comparação entre cada um dos quatro tratamentos com o controle e a análise de variância foi realizada visando comparar efeitos entre diluentes e entre diluições. Todos no tempo inicial (T_i) e final (T_f).

Foi utilizado o programa SPSS 13.0 (Statistical Program for Social Sciences) para as análises estatísticas, considerando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou parâmetros de motilidade e viabilidade espermáticas após a descongelação e diluição do sêmen mantendo-se as concentrações finais do crioprotetor em 2,5 e 1,25%, utilizando-se os diluentes FR4[®] e Botu-Crio[®]. Não houve efeito de ganhão e/ou entre ejaculados de um mesmo ganhão. As médias de motilidade espermática total (MT) e progressiva (MP) no controle dos animais estudados foram de 59% e 16%, respectivamente, e de 48% de integridade de membrana plasmática no teste de epifluorescência (IMP).

Observou-se diferença significativa entre as médias dos tratamentos (controle, 1, 2, 3 e 4) para MP, VSL, ALH e BCF no tempo inicial (Ti), não sendo observada diferença significativa ($P>0,05$) para MT, VAP, VCL, RAP e IMP. No tempo final (Tf), foram observadas diferenças significativas ($P<0,05$) para MT, MP, VAP, VSL, VCL, BCF e RAP; não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) para IMP, entre as médias dos tratamentos (Figura 1; Tabela 2).

Houve diferença ($P<0,05$) na MP quando utilizado o diluidor Botu-Crio[®]: controle (15,8%), BOT50 (28,5%) e BOT25 (25,9%) e ALH (7,7; 6,6; 6,9, respectivamente). Observou-se ainda, diferença para BCF entre controle e BOT50, FR25 e BOT25; para VSL entre controle e todos os tratamentos. Não houve diferença ($P>0,05$) na MT, VAP, VCL e RAP (Figura 1; Tabela 2). Já no teste de integridade de membrana (IMP) não houve diferença entre os tratamentos. Os resultados diferem dos observados por WESSEL & BALL (2004) em que a rápida remoção do glicerol de sêmen equino a fresco resultou numa redução da motilidade e da integridade de membrana dos espermatozoides, enquanto a diluição seriada do glicerol desse mesmo sêmen resultou numa melhora na manutenção tanto da motilidade, quanto da integridade de membrana

dos espermatozoides, concluindo não haver efeito benéfico similar quando feita a diluição seriada com o sêmen criopreservado.

Para o tempo final (Tf), houve diferença ($P < 0,05$) na MP entre o controle, FR50, BOT50, FR25 e BOT25, também para VAP, VSL, VCL e RAP; na MT entre controle e FR50, BOT50 e BOT25; para BCF entre controle e BOT50 e BOT25. Não houve diferença ($P > 0,05$) para IMP e para ALH (Figura 1; Tabela 2).

Quando comparado o diluente e diluição em fatorial (4X4), observou-se diferença ($P < 0,05$) somente para ALH e BCF no tempo inicial (Ti) entre os diluentes testados, não havendo diferença ($P > 0,05$) entre diluições. Já no tempo final (Tf), para as médias entre diluentes houve diferença ($P < 0,05$) na MT (37% e 42%), MP (12% e 17%), ALH (7,5 e 7,0) e BCF (25 e 29), respectivamente, com FR4[®] e Botu-Crio[®]; não havendo diferença ($P > 0,05$) na VAP, VSL, VCL, RAP e IMP. Não houve diferença entre diluições (50% ou 25%) para todos os parâmetros analisados, dados que concordam com os de WESSEL & BALL (2004) em que o tipo de diluição em seu experimento após a descongelação não afetou a motilidade espermática total e progressiva dos espermatozoides, observando, entretanto efeito entre ganhões. No presente estudo não foi observada interação entre diluentes e diluições em ambos os tempos (Tabela 1).

A análise feita no tempo final, 1 hora após as primeiras avaliações, indicou melhora e diferença ($P < 0,05$) em todos os parâmetros analisados, exceto o deslocamento lateral de cabeça (ALH) e integridade de membrana (IMP), indicando que uma diluição do crioprotetor após a descongelação pode aumentar a sobrevivência das células espermáticas sem que ocorram lesões às suas membranas. Foi observada ainda, melhora ($P < 0,05$) nos parâmetros de MP e MT para o sêmen tratado com o diluente Botu-Crio[®]

quando comparado com o FR4[®]. Estudo feito por MELO et al. (2006) com o diluidor Botu-Crio[®] demonstraram que, apesar das amidas utilizadas em seu experimento apresentarem estruturas químicas semelhantes, uma combinação entre este diluente e dimetilacetamida a 4% mostrou superioridade na proteção espermática durante o processo de congelação em relação à associação entre o diluidor e dimetilformamida a 4%, embora não houvesse diferença significativa no teste de fertilidade entre ambos.

Alguns estudos relataram os benefícios teóricos de uma diluição seriada para remoção dos crioprotetores de sêmen congelado em humanos, entretanto há poucos resultados experimentais a cerca dos efeitos nas células espermáticas, tornando os dados ainda pouco consistentes (GAO et al., 1995; GILMORE et al., 1997). GAO et al. (1995) observaram ser a motilidade espermática muito mais sensível a condições anisomóticas do que a integridade de membrana; sendo que a motilidade espermática demonstrou ser ainda mais sensível às condições hipo do que hipertônicas em células humanas. Segundo BALL & VO (2001), uma rápida remoção de crioprotetores permeáveis resultam em um possível choque hiposmótico quando diluídos em meios extensores ou nos fluidos do trato reprodutivo das éguas.

CONCLUSÕES

As diluições pós-descongelação de sêmen equino criopreservado com crioprotetor dimetilformamida a 5% utilizando dois diluentes comerciais (Botu-Crio[®] e FR4[®]) proporcionaram uma maior sobrevivência das células espermáticas. O diluente Botu-Crio[®] proporciona melhores resultados comparado ao diluente FR4[®]. Estes resultados devem ser confirmados em testes *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Ao Cnpq pelo auxílio financeiro e provimento de bolsas.

REFERÊNCIAS

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

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, Issues 1-4, p. 65-75, 2005.

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

DE LEEUW, F.E. et al. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, n.27, p. 171-183, 1990.

DEVIREDDY, R.V. et al. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. **Biology Reproduction**, n.66, p.222-231, 2002.

GAO, D.Y. et al. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Human Reproduction**, n.10, p.1109-1122, 1995. (Resumo)

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

MELO, C.M. et al. Utilização de diferentes diluentes de centrifugação e crioprotetores na fertilidade de sêmen congelado equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, 34 (supl.1), p.566, 2006.

METCALF, E.L. The effect of post-insemination endometritis on fertility of frozen stallion semen. In: 46th Ann. Conv. AAEP. **Proceedings.**, p.332-400, 2000.

POMMER, A.C. et al. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. **Theriogenology**, n.58, p. 1373-1384, 2002.

SQUIRES, E.L. Integration of future biotechnologies into the equine industry. **Animal Reproduction Science**, v. 89, Issues 1-4, p.187-198, oct.2005.

SPSS 13.0, Statistical Program for Social Sciences for windows.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved sêmen. **Animal Reproduction Science**, n.60-61, pgs.481-492, 2000.

WESSEL, M.T.; BALL, B.A. Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, n.84, p.147-156, 2004.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina.** Tese (doutorado) – Curso de Pós-graduação em Reprodução Animal, da FMVZ – UNESP, Botucatu, SP, 1998.

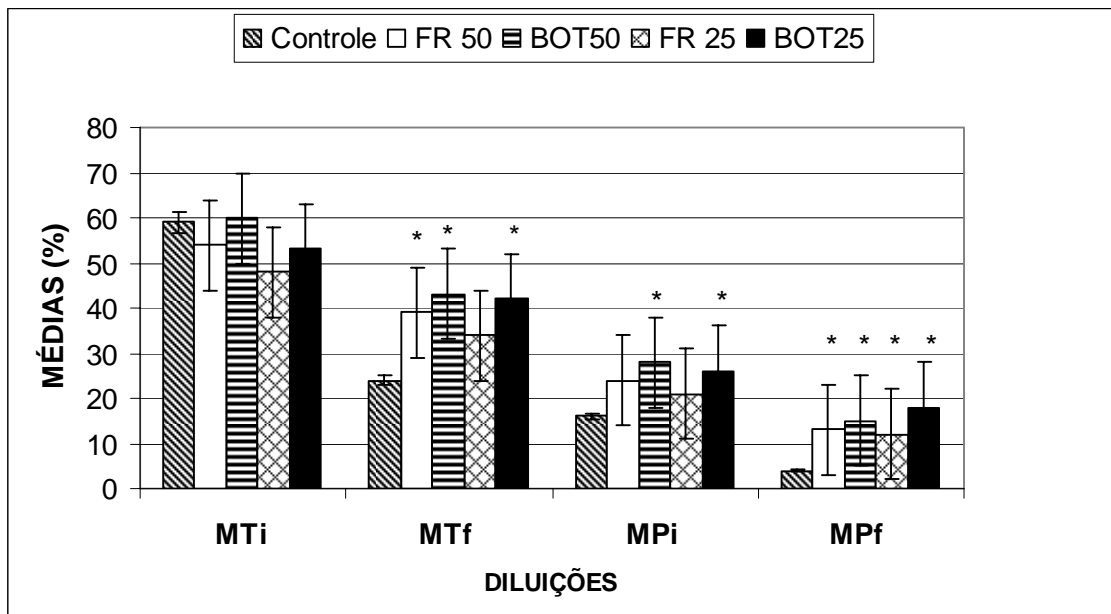


Figura 1: Expressão gráfica das médias em porcentagem, através do teste de Dunnett, comparando o controle com os demais tratamentos e utilizando as variáveis MTi: motilidade total inicial, MTf: motilidade total final, MPi: motilidade progressiva inicial, MPf: motilidade progressiva final; * Representa diferença estatística ($P < 0,05$).

Tabela 1: Comparação das médias (\pm) entre os diluentes e as diluições da motilidade espermática total e progressiva e de integridade de membrana plasmática de sêmen equino descongelado e tratado com diferentes diluentes (FR4® e BOTUCRIO®) e diluições (50 e 25%) no tempo final (Tf) :

	FR50	FR25	FR TOTAL	BOT50	BOT25	BOT TOTAL	TOTAL50	TOTAL25	TOTAL %
MT	39,0	34,5	37,2	43,1	41,8	42,4*	41,2	39,2	40,2
MP	13,2	11,7	12,6	14,9	18,5	16,8*	14,1	16,1	15,0
IMP	40,2	37,8	39,3	42,9	40,3	41,5	41,6	39,4	40,6

MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; IMP: integridade de membrana

valores com diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 2: Médias (\pm), desvio-padrão e diferença significativa ($P<0,05$) dos tratamentos de sêmen equino descongelado e tratado, avaliados pelo CASA e pelo teste de epifluorescência (IMP) no tempo inicial (T_i) e final (T_f):

Var. indep.	T INICIAL (T=0)					T FINAL (T=1)				
	Controle	FR 50	BOT50	FR 25	BOT25	Controle	FR 50	BOT50	FR 25	BOT 25
MT (%)	59 \pm 8,8 ^a	53 \pm 8,5 ^a	60 \pm 9,1 ^a	48 \pm 6,9 ^a	53 \pm 12,5 ^a	24 \pm 9,3 ^a	39 \pm 7,7 ^b	43 \pm 9,18 ^b	34 \pm 10,2 ^{a,b}	41 \pm 4,6 ^b
MP (%)	16 \pm 4,6 ^a	24 \pm 3,9 ^{a,b}	28 \pm 7,5 ^b	21 \pm 6,8 ^{a,b}	26 \pm 9,2 ^b	4 \pm 5,5 ^a	13 \pm 4,8 ^{b,c}	15 \pm 5,8 ^{b,c}	11 \pm 4,58 ^b	18 \pm 3,8 ^c
VAP (μm/s)	97 \pm 10,5 ^a	106 \pm 7,7 ^a	103 \pm 5,4 ^a	104 \pm 10,3 ^a	101 \pm 11,6 ^a	67 \pm 7,1 ^a	91 \pm 10,2 ^b	89 \pm 8,4 ^b	94 \pm 5,52 ^b	95 \pm 6,6 ^b
VSL (μm/s)	69 \pm 7,6 ^a	81 \pm 4,2 ^b	80 \pm 5,6 ^b	81 \pm 9,0 ^b	79 \pm 9,6 ^b	47 \pm 5,6 ^a	69 \pm 8,3 ^b	68 \pm 7,34 ^b	71 \pm 5,01 ^b	74 \pm 5,8 ^b
VCL (μm/s)	180 \pm 18,8 ^a	197 \pm 12,4 ^a	181 \pm 12,8 ^a	171 \pm 65,6 ^a	176 \pm 22,6 ^a	133 \pm 14,3 ^a	169 \pm 21,3 ^b	168 \pm 18,2 ^b	175 \pm 10,3 ^b	169 \pm 15,2 ^b
ALH (μm/s)	7,7 \pm 0,2 ^{b,c}	8,1 \pm 0,4 ^c	6,7 \pm 0,5 ^a	8,0 \pm 0,9 ^c	6,9 \pm 0,9 ^{a,b}	7,3 \pm 0,4 ^a	7,3 \pm 0,6 ^a	7,3 \pm 0,7 ^a	7,7 \pm 0,57 ^a	6,8 \pm 0,7 ^a
BCF	24 \pm 3,1 ^a	26 \pm 2,0 ^a	30 \pm 2,8 ^b	27 \pm 1,6 ^{a,b}	30 \pm 3,6 ^b	21 \pm 5,7 ^a	26 \pm 3,3 ^b	28 \pm 4,4 ^b	23 \pm 2,51 ^{a,b}	29 \pm 4,3 ^b
RAP (%)	41 \pm 9,9 ^a	42 \pm 7,4 ^a	49 \pm 8,4 ^a	39 \pm 6,2 ^a	41 \pm 12,5 ^a	10 \pm 5,4 ^a	28 \pm 8,7 ^b	29 \pm 8,6 ^b	24 \pm 7,88 ^b	31 \pm 3,5 ^b
IMP (%)	48 \pm 6,9 ^a	49 \pm 8,2 ^a	50 \pm 6,2 ^a	46 \pm 5,7 ^a	46 \pm 7,9 ^a	36 \pm 12,7 ^a	40 \pm 6,3 ^a	43 \pm 3,8 ^a	38 \pm 7,34 ^a	40 \pm 7,0 ^a

MT: motilidade total inicial; MP: motilidade progressiva; VAP: velocidade média; VSL: velocidade progressiva; VCL: velocidade curvilinear; ALH: deslocamento lateral de cabeça; BCF: frequência de batimento flagelar ; RAP: quantidade de espermatozoides rápidos; IMP: integridade de membrana; Valores com letras diferentes (a, b, c) na mesma linha têm diferença estatística ($P<0,05$).

ANEXOS:

Anexo I:

AJUSTE DO HTMA-IVOS-10 PARA ANÁLISE SEMINAL EM EQÜINOS

CARACTERÍSTICAS	AJUSTE
Número de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células imóveis	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	80%
Referência para velocidade média (VAP)	<70 µm/s
Referência para velocidade alta (VCL)	<30 µm/s
Referência para velocidade lenta (VSL)	<20 µm/s
Limite inferior de tamanho	0,62 pixels
Limite superior de tamanho	2,98 pixels
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 II

PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

SOLUÇÕES	CONSTITUINTES	QUANTIDADE
Estoque IP	Iodeto de Propídio ¹ Solução Fisiológica	10mg 20mL
Estoque CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína ² DMSO	9,2mg 20mL
Estoque de Formaldeído	Formalina a 40% Solução Fisiológica	1mL 79mL
Estoque de Citrato de Sódio	Citrato de Sódio Solução Fisiológica	3g 100mL

¹ P 4170 - Sigma

² C 5041 - Sigma

SOLUÇÃO DE TRABALHO

SOLUÇÃO	QUANTIDADE
Solução de Citrato de Sódio 3%	0,96mL
Solução de Formaldeído	10 µl
Solução de Iodeto de Propídio	10 µl
Solução de Carboxifluoresceína	20 µl