

Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen eqüino

[Effect of different freezing extenders on post thaw equine spermatozoa viability]

P.P.N. Snoeck¹, M. Henry², M.I.V. Melo³

¹Universidade Estadual de Santa Cruz
Rod. Ilhéus-Itabuna, km 16,
45.650-000 – Ilhéus, BA

²Escola de Veterinária – UFMG – Belo Horizonte, MG

³Pontifícia Universidade Católica – Belo Horizonte, MG

RESUMO

Estudou-se o efeito de diferentes concentrações de gema de ovo, açúcares e tampões nos diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen eqüino. Os diluidores foram: D1 = 10% de gema de ovo e acréscimo de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5; D2= 10% de gema de ovo e redução de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5; D3= 20% de gema de ovo e acréscimo de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5; D4= 20% de gema de ovo e redução de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5; D5= 20% de gema de ovo e composição de lactose e glicose-EDTA segundo Martin et al. (1979). Cinco ejaculados de seis garanhões foram utilizados para testar os diluidores contendo diferentes agentes crioprotetores: 3,5% de etilenoglicol e 5% de acetamida. Após diluição final nos diferentes diluidores, o sêmen foi submetido a diferentes protocolos de congelação: com e sem resfriamento prévio. Após descongelação em banho-maria a 75°C, avaliaram-se a motilidade, o vigor, e a integridade estrutural e funcional das membranas espermáticas. A redução na concentração de gema de ovo de 20% para 10%, nos diluidores contendo a mesma concentração de açúcares e tampões, não alterou a capacidade crioprotetora dos diluidores com etilenoglicol ou acetamida. O aumento na concentração de açúcares e tampões no diluidor lactose-EDTA-gema de ovo não acrescentou efeito crioprotetor ao etilenoglicol e acetamida. Diluidores com maior osmolaridade tenderam a preservar melhor o sêmen eqüino congelado com etilenoglicol ou acetamida. Os melhores resultados de viabilidade espermática, pós-descongelação, foram para o sêmen congelado nos diluidores D1, D3 e D5 (P<0,05).

Palavras-chave: eqüino, sêmen, criopreservação, diluidor

ABSTRACT

The effect of different egg yolk, sugars and buffering systems concentrations in the freezability of different equine semen extenders was studied. Extenders were: D1=10% of egg yolk added of more 50% over the lactose and glucose-EDTA levels found in D5; D2=10% of egg yolk and reduction of 50% over the lactose and glucose-EDTA levels in D5; D3=20% of egg yolk added of more 50% over the lactose and glucose-EDTA levels in D5; D4=20% of egg yolk and reduction of 50% over the lactose and glucose-EDTA levels in D5; D5=20% of egg yolk and lactose and glucose-EDTA according to Martin et al. (1979). Five ejaculates of six stallions were used to test extenders using alternatively two different cryoprotectants agents: 3.5% ethylene glycol and 5% acetamide. After the final dilution, the semen was submitted to different freezing rates. Straws were thawed at 75° C during 7 seconds, followed by immersion at 37° C during 5 seconds. After thawing motility, vigour, structural and functional integrity of the membrane of the spermatozoa were evaluated. The reduction in the egg yolk concentration from 20% to 10%, in extenders with the same concentration of sugars and buffering systems, did not modify the cryoprotectant capacity of the extender with ethylene glycol or acetamide. The increase in the concentration of sugars and buffering systems in the lactose-EDTA-egg yolk extender did not add cryoprotectant effect to ethylene glycol and acetamide. Extenders with high osmolarity

Recebido em 22 de julho de 2005

Aceito em 30 de novembro de 2006

E-mail: paolasnoeck@uesc.br

Efeito de diferentes diluidores...

had tended to better preserve the frozen equine semen with ethylene glycol or acetamide. Better results of spermatic viability, after thawing, were obtained when semen was diluted in D1, D3 and D5 extender (P<0.05).

Keywords: equine, semen, cryopreservation, extender

INTRODUÇÃO

A composição dos diluidores de congelação de sêmen pode afetar os resultados do processo de criopreservação. A proteção das células durante a fase de desidratação que ocorre durante a congelação e a estabilização da bicamada lipídica, como o impedimento da fusão de partículas intramembranas, depende das substâncias que compõem o diluidor (Crowe et al., 1987).

Alguns diluidores são mais utilizados para o processo de congelação de sêmen equino, dentre eles estão o diluidor Naumienkov e Romankova (Tischner, 1979); o INRA 82, com várias concentrações de gema de ovo e glicerol (Palmer, 1984); o diluidor proposto por Martin et al. (1979), formulado com lactose-EDTA-gema de ovo e o diluidor Kenney, acrescido de gema de ovo e glicerol (Burns, 1992; Burns e Reasner, 1995). A maioria dos diluidores possui em sua formulação açúcares, eletrólitos, gema de ovo; em concentração variável de 1,6 a 20%, e glicerol, variando entre 2,5 e 5%. Os diluidores como o INRA 82 e o Kenney, além dos componentes anteriormente citados, possuem leite na sua composição.

Outros meios de congelação incluem o meio Gent, à base de açúcares, leite, tampões, 5% de gema de ovo e 5% de glicerol; o meio MP-50, constituído de gema de ovo, leite desnatado, Dulbeccos Basal Medium Eagle (BME) e uma associação de glicerol e dimetilformamida (Gomes et al., 2002; Papa et al., 2002); o meio glicina gema de ovo (Papa et al., 1993); e o meio BME-adaptado, formulado a partir de uma associação de meios: Merk-gema (33%), Kenney (31,7%) e Dulbeccos Basal Medium Eagle (31,7%) (Neves Neto et al., 1999). Considerando esses dados, fica evidente, na literatura consultada, que uma grande diversidade de diluidores de congelação tem sido testada para o sêmen equino. Essa variabilidade de composição é indicativa de que ainda não foi encontrado um diluidor que preserve a viabilidade espermática

pós-descongelação para a maioria dos garanhões. Uma das causas que leva à existência dessa diversidade de meios diluidores deve estar ligada ao fato de existir uma variabilidade na sensibilidade espermática à congelação/descongelação entre garanhões e/ou entre ejaculados de um mesmo garanhão (Samper et al., 1991).

Foi objetivo deste experimento testar a eficácia de crioprotetores intracelulares alternativos e o efeito da osmolaridade utilizando-se diferentes meios de congelação à base de lactose-EDTA-gema de ovo, sobre a viabilidade espermática pós-descongelação de sêmen equino.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis garanhões, sendo cinco da raça Mangalarga Marchador e um Bretão, com idades variando entre três e 15 anos. Previamente ao processamento do sêmen, os garanhões foram submetidos a uma colheita de sêmen (vagina artificial) diária, por sete dias consecutivos, para equilibrar as reservas extragonadais. Cinco ejaculados de cada garanhão foram submetidos à congelação, mantendo-se um intervalo entre colheitas, de três dias.

Imediatamente após a colheita, foram avaliados a motilidade total e progressiva e vigor espermáticos (Manual..., 1998) e realizado o teste hiposmótico (HO), para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática (Melo e Henry, 1999). Após análise, somente ejaculados que apresentaram motilidade espermática progressiva mínima de 50% foram submetidos à congelação. Na seqüência, o sêmen foi diluído 1:2 no diluidor de centrifugação glicose-EDTA proposto por Martin et al. (1979), sendo centrifugado a 400xg por 10 minutos. Após a centrifugação, foi mantido de 10% a 20% de plasma seminal, e a ressuspensão dos espermatozoides nos meios de congelação foi ajustada de forma a obter 100 milhões de espermatozoides/ml.

As amostras foram, então, submetidas a duas curvas de congelamento. A primeira foi denominada de curva rápida com resfriamento prévio lento; para isso, as amostras foram resfriadas (-0,13°C/min) em geladeira doméstica por duas horas e meia até a temperatura de 5°C; depois, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5ml e submetido à congelamento, em caixa de isopor, 3cm acima da fase líquida do nitrogênio, durante 10 minutos; durante o envase, o sêmen permaneceu em sacos plásticos estéreis submersos em água a 5°C, no intuito de evitar grandes variações de temperatura. A segunda curva de congelamento foi denominada de curva rápida sem resfriamento; nesse caso, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5ml, imediatamente após a diluição final, e congelado como descrito anteriormente. As amostras foram, por conseguinte, armazenadas em botijão até a descongelamento e avaliação.

A descongelamento das amostras foi realizada em banho-maria a 75°C, por sete segundos, seguida de imersão em banho-maria a 37°C, por cinco segundos. Após descongelamento, avaliou-se a motilidade progressiva, o vigor, a morfologia espermática, a integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal por meio de

sondas fluorescentes (Harrison e Vickers, 1990, modificado por Zúccari, 1998), e a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides por meio do teste HO (Melo e Henry, 1999).

Neste experimento, foram testados cinco diluidores à base de lactose-EDTA-gema de ovo com diferentes concentrações de crioprotetores intracelulares, gema de ovo, açúcares e tampões. Para tanto, considerou-se como controle o meio de congelamento D5 constituído de lactose-EDTA-gema de ovo descrito por Martin et al. (1979). O D1 foi preparado com 10% de gema de ovo e acréscimo de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5; o D2 apresentou 10% de gema de ovo e redução de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5; o D3 foi formulado com 20% de gema de ovo e acréscimo de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5; e o D4 com 20% de gema de ovo e redução de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5. Em cada meio diluidor base, o glicerol foi substituído por 3,5% de etilenoglicol ou 5% de acetamida sempre associada a 0,5% de metilcelulose e 0,165g/100ml de trealose (Tab.1).

Tabela 1. Composição dos cinco diluidores de congelamento à base de lactose-EDTA-gema de ovo usados para sêmen equino

Crioprotetor/Reagente	D1		D2		D3		D4		D5	
	E3,5%	A5%	E3,5%	A%	E3,5%	A5%	E3,5%	A5%	E3,5%	A5%
Lactose 50ml	16,5%	16,5%	5,5%	5,5%	16,5%	16,5%	5,5%	5,5%	11%	11%
Glicose-EDTA	- (25 ml):									
Glicose (g)	9	9	3	3	9	9	3	3	6	6
EDTA (g)	0,555	0,555	0,185	0,185	0,555	0,555	0,185	0,185	0,370	0,370
Citrato de sódio (g)	0,560	0,560	0,188	0,188	0,560	0,560	0,188	0,188	0,375	0,375
Bicarbonato de sódio (g)	0,18	0,18	0,06	0,06	0,18	0,18	0,06	0,06	0,12	0,12
Estreptomicina (g)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Penicilina (UI)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Água (ml)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Gema de ovo	10ml	10ml	10ml	10ml	20ml	20ml	20ml	20ml	20ml	20ml
Equex STM	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml	0,5ml
Crioprotetor	3,5ml	5g	3,5ml	5g	3,5ml	5g	3,5ml	5g	3,5ml	5g
Metilcelulose(g)	-	0,5	-	0,5	-	0,5	-	0,5	-	0,5
Trealose (g)	-	0,165	-	0,165	-	0,165	-	0,165	-	0,165

D1:10% de gema de ovo e acréscimo de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5; D2:10% de gema de ovo e redução de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5; D3:20% de gema de ovo e acréscimo de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5; e D4:20% de gema de ovo e redução de 50% de lactose e glicose-EDTA em relação ao D5; D5:20% de gema de ovo e composição de lactose e de glicose-EDTA, segundo Martin et al. (1979). Crioprotetores intracelulares: etilenoglicol (E 3,5%) e acetamida (A 5%). Equex STM – Nova Chemical Sales, INC.

Efeito de diferentes diluidores...

A osmolaridade¹ e o pH² dos meios de congelamento estão na Tab 2.

O delineamento experimental foi de parcelas subdivididas. Os diluidores foram considerados as parcelas, e o fatorial (dois crioprotetores x duas curvas de congelamento) foi considerado a subparcela. O ganhão foi considerado como bloco, e os diferentes ejaculados de um mesmo ganhão foram selecionados ao acaso para serem congelados em diluidores distintos, para que todos os tratamentos (diluidor x crioprotetor intracelular x curva de congelamento) fossem testados. O efeito dos fatores composição do meio diluidor, crioprotetor e curva de congelamento

foi avaliado via análise de variância. As médias obtidas para os diferentes parâmetros (motilidade, integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal e integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides) foram comparadas pelo teste Duncan. As variáveis que apresentaram valores percentuais com grande amplitude de variação foram transformadas para ângulo, correspondendo a arco-seno $\sqrt{X/100}$. A variável vigor, que não apresentou distribuição normal foi comparada pelo teste de Kruskal – Wallis (Sampaio, 1998). Na análise, foi utilizado o programa estatístico SAEG (Sistema..., 1997).

Tabela 2. Meios diluidores de congelamento de sêmen equino: osmolaridade e pH

Diluidor	Crioprotetor	Osmolaridade com crioprotetor	Osmolaridade sem crioprotetor	pH
D1	Etilenoglicol 3,5%	810 mOsmol/l	580 mOsmol/l	6,50
	Acetamida 5%	925 mOsmol/l	606 mOsmol/l	6,86
D2	Etilenoglicol 3,5%	685 mOsmol/l	195 mOsmol/l	6,57
	Acetamida 5%	880 mOsmol/l	220 mOsmol/l	6,27
D3	Etilenoglicol 3,5%	780 mOsmol/l	575 mOsmol/l	6,40
	Acetamida 5%	950 mOsmol/l	692 mOsmol/l	6,40
D4	Etilenoglicol 3,5%	555 mOsmol/l	207 mOsmol/l	6,49
	Acetamida 5%	950 mOsmol/l	257 mOsmol/l	6,56
D5	Etilenoglicol 3,5%	1130 mOsmol/l	400 mOsmol/l	6,48
	Acetamida 5%	1480 mOsmol/l	445 mOsmol/l	6,38

D1:10% de gema de ovo e acréscimo de 50% de lactose e glicose-EDTA; D2:10% de gema de ovo e redução de 50% de lactose e glicose-EDTA; D3:20% de gema de ovo e acréscimo de 50% de lactose e glicose-EDTA; e D4:20% de gema de ovo e redução de 50% de lactose e glicose-EDTA do que o D5; D5:20% de gema de ovo e composição de lactose e de glicose-EDTA, segundo Martin et al. (1979).

RESULTADOS

Os resultados de motilidade espermática progressiva e vigor para cada tratamento estão na Tab. 3 e 4, respectivamente. Em comparações feitas entre crioprotetores em cada diluidor (D1-D5), observou-se que o crioprotetor acetamida preservou melhor a motilidade do que o etilenoglicol nos diluidores D1 e D3, independente da curva de congelamento utilizada. Esse crioprotetor também preservou melhor o vigor, quando comparado à amostra congelada com resfriamento prévio em geladeira no diluidor D3, contendo etilenoglicol

($P < 0,05$). Nos diluidores D2 e D4, não foi observada qualquer diferença entre os crioprotetores e as curvas utilizadas ($P > 0,05$). No D5, a motilidade pós-descongelamento superior foi no diluidor com o crioprotetor acetamida, quando utilizado o resfriamento lento antes da congelamento ($P < 0,05$). O vigor espermático pós-descongelamento foi a única característica que apresentou diferença entre os diluidores (D1-D5) em comparação feita independente do crioprotetor intracelular e da curva de congelamento. O mesmo foi menor nas amostras submetidas à congelamento em meio diluidor D2 comparado aos meios D1, D3 e D5 ($P < 0,05$).

¹ μ OSMETTE TM, Model 5004 – Automatic Osmometer- Natick MA - USA

²pHmetro DM 20 - Digimed

Tabela 3. Motilidade espermática (%) do sêmen de garanhões após a descongelação utilizando diferentes protocolos de congelação (média de seis garanhões)

Crioprotetor	Curva de congelação	Diluidor				
		D1	D2	D3	D4	D5
Etilenoglicol 3,5%	CR	21,3±7,1aB	13,3±7,0aA	19,0±7,9aB	16,6±5,9aA	37,9±15,5aB
	SR	23,8±10,0aB	13,3±8,8aA	24,8±13,3aB	17,1±8,0aA	45,8±18,3aAB
Acetamida 5%	CR	30,3±15,3aA	16,3±8,0aA	40,4±14,4aA	15,4±8,1aA	49,6±8,6aA
	SR	34,0±15,1aA	17,1±12,0aA	38,3±13,5aA	18,8±7,5aA	42,5±15,5aAB

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na linha diferem entre si ($P<0,05$).

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si ($P<0,05$).

CR:congelação rápida com resfriamento lento; SR:congelação rápida sem resfriamento lento. D1:10% de gema de ovo e acréscimo de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D2:10% de gema de ovo e redução de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D3:20% de gema de ovo e acréscimo de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D4:20% de gema de ovo e redução de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D5:meio diluidor semelhante ao proposto por Martin et al. (1979), com 20% de gema de ovo, lactose-glicose-EDTA.

Tabela 4. Vigor do movimento espermático (escala de 0 a 5) do sêmen de garanhões após a descongelação utilizando diferentes protocolos de congelação (média de seis garanhões)

Crioprotetor	Curva de congelação	Diluidor				
		D1	D2	D3	D4	D5
Etilenoglicol 3,5%	CR	2,2±0,4aA	1,4±0,5bA	1,8±0,5aB	1,8±0,8abA	2,3±0,4aA
	SR	2,3±0,6aA	1,3±0,5bA	2,6±0,7aA	1,8±0,8abA	2,4±0,7aA
Acetamida 5%	CR	2,3±0,6aA	1,6±0,5bA	2,6±0,6aA	1,7±0,4abA	2,5±0,4aA
	SR	2,5±0,5aA	1,3±0,5bA	2,7±0,5aA	2,3±0,4abA	2,6±0,5aA

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na linha diferem entre si ($P<0,05$).

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si ($P<0,05$).

CR:congelação rápida com resfriamento lento; SR:congelação rápida sem resfriamento lento. D1:10% de gema de ovo e acréscimo de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D2:0% de gema de ovo e redução de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D3:20% de gema de ovo e acréscimo de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D4:20% de gema de ovo e redução de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D5:meio diluidor semelhante ao proposto por Martin et al. (1979), com 20% de gema de ovo, lactose-glicose-EDTA.

Na Tab. 5, apresenta-se a porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal estruturalmente íntegras, avaliadas por meio das sondas fluorescentes após a descongelação. Os meios diluidores D3 e D5, com utilização de curva de congelação com resfriamento prévio, independente do uso do etilenoglicol ou acetamida como crioprotetores, preservaram melhor a integridade das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides que os diluidores D2 e D4 ($P<0,05$). Os diluidores D1, D3 e D5, contendo o crioprotetor etilenoglicol a 3,5% e submetidos a congelação rápida sem resfriamento prévio, preservaram melhor a integridade estrutural das membranas espermáticas que os diluidores D2 e D4 ($P<0,05$). O diluidor D3 contendo o crioprotetor acetamida 5% preservou melhor a integridade estrutural das membranas dos espermatozoides durante a criopreservação que

os diluidores D2 e D4 ($P<0,05$), após o sêmen ser congelado sem resfriamento prévio. Em cada diluidor (D1-D5), não houve efeito do crioprotetor intracelular e curva de congelação sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal pós-descongelação ($P>0,05$).

Os resultados do teste hiposmótico são apresentados na Tab. 6. A única diferença observada foi entre os diluidores D2 e D5 contendo 3,5% de etilenoglicol quando congelados sem resfriamento prévio. A porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico pós-descongelação foi superior no D5 do que no D2 ($P<0,05$). Em cada diluidor, separadamente, não houve diferença entre os crioprotetores e as curvas de congelação na porcentagem de espermatozoides com integridade funcional da membrana plasmática ($P>0,05$).

Efeito de diferentes diluidores...

Tabela 5. Porcentagem de espermatozoides equinos submetidos a diferentes protocolos de criopreservação com membranas plasmática e acrossomal íntegras, avaliadas por meio das sondas fluorescentes, após a descongelação

Crioprotetor	Curva de congelação	Diluidor				
		D1	D2	D3	D4	D5
Etilenoglicol 3,5%	CR	31,0±11,9abA	10,3±5,9cA	46,8±21,9aA	20,8±9,1bA	43,3±14,2aA
	SR	39,3±16,3aA	14,5±12,3bA	48,2±16,1aA	23,0±10,4bA	38,7±13,2aA
Acetamida 5%	CR	33,7±12,8abA	19,3±15,8cA	41,7±11,5aA	25,7±13,3bcA	45,0±13,8aA
	SR	35,3±20,3abA	22,3±14,4bA	48,0±19,8aA	23,3±10,3bA	35,3±14,7abA

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na linha diferem entre si ($P<0,05$).

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si ($P<0,05$).

CR:congelação rápida com resfriamento lento; SR:congelação rápida sem resfriamento lento. D1:10% de gema de ovo e acréscimo de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D2:10% de gema de ovo e redução de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D3:20% de gema de ovo e acréscimo de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D4:20% de gema de ovo e redução de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D5:meio diluidor semelhante ao proposto por Martin et al. (1979), com 20% de gema de ovo, lactose-glicose-EDTA.

Tabela 6. Porcentagem de espermatozoides equinos reativos ao teste hiposmótico após a descongelação utilizando-se diferentes protocolos de criopreservação

Crioprotetor	Curva de congelação	Diluidor				
		D1	D2	D3	D4	D5
Etilenoglicol 3,5%	CR	18,8±10,1aA	2,8±3,8aA	20,2±19,5aA	3,0±4,7aA	34,3±20,2aA
	SR	17,3±15,0abA	0,0±0,0bA	19,0±17,4abA	3,0±3,7abA	30,0±14,4aA
Acetamida 5%	CR	17,3±14,8aA	2,8±3,8aA	13,8±11,3aA	12,5±10,5aA	37,8±12,3aA
	SR	14,2±14,4aA	2,2±3,4aA	7,5±7,6aA	6,8±5,9aA	28,2±18,7aA

Médias seguidas por letras minúsculas distintas na linha diferem entre si ($P<0,05$).

Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si ($P<0,05$).

CR:congelação rápida com resfriamento lento; SR:congelação rápida sem resfriamento lento. D1:10% de gema de ovo e acréscimo de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D2:10% de gema de ovo e redução de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D3:20% de gema de ovo e acréscimo de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D4:20% de gema de ovo e redução de 50% de açúcares e tampões em relação ao D5; D5:meio diluidor semelhante ao proposto por Martin et al. (1979), com 20% de gema de ovo, lactose-glicose-EDTA.

DISCUSSÃO

A motilidade progressiva foi a única característica que variou significativamente entre os crioprotetores intracelulares utilizados. Os melhores resultados foram encontrados nos meios contendo acetamida do que naqueles com etilenoglicol, dependendo do diluidor utilizado. Essas semelhanças na capacidade de crioproteção entre crioprotetores intracelulares em meios de congelação de sêmen equino com a mesma composição de açúcares, tampões e gema de ovo e/ou leite também foram encontradas por Graham (2000), Medeiros et al. (2002) e Vidament et al. (2002). Parece que muitos agentes crioprotetores são eficazes durante a congelação de sêmen equino, podendo substituir o glicerol sem prejuízo aos espermatozoides durante a criopreservação.

Quanto às características espermáticas, não houve alteração naquelas avaliadas (motilidade, vigor espermático e integridade funcional (HO)

da membrana plasmática dos espermatozoides) após a descongelação com a redução da concentração de gema de ovo de 20% para 10%, nos diluidores com menor (D2 e D4) e maior (D1 e D3) concentração de açúcares e tampões, independentemente do crioprotetor intracelular utilizado. Quanto à quantidade de fosfolípidios, a proporção contida em 10% de gema de ovo (1,1%) já está acima da considerada ótima (entre 0,5% e 1,0%) por Pickett e Berndtson (1978). A concentração de gema de ovo nos diluidores de congelação de sêmen equino tem variado de 2% (Tischner, 1979; Palmer, 1984; Ecot et al., 2000; Vidament et al., 2001) a 20% (Martin et al., 1979; Braun et al., 1995), e sua substituição por componentes protéicos, como soro equino ou soro bovino ou albumina sérica bovina, nos diluidores usados para a congelação de sêmen equino, não tem proporcionado melhor efeito crioprotetor aos espermatozoides que a gema de ovo sozinha (Angola e Quintero, 1996) ou associada ao leite (Jasko et al., 1992; Braun et al., 1995; Juliani et al., 2002). Com tais

resultados, a redução na porcentagem de espermatozoides estruturalmente íntegros observada em tratamentos contendo 10% de gema parece ser mais resultante da queda da osmolaridade ou composição do meio que o efeito da redução de gema de ovo, haja vista que meios com 10% de gema, mas com osmolaridade acima do diluidor-controle, mostraram-se igualmente eficientes em preservar a integridade estrutural das membranas espermáticas.

Independentemente da quantidade de gema de ovo, do crioprotetor intracelular utilizado, diluidores com maior concentração de açúcares e tampões (D1 e D3) e o diluidor-controle lactose-EDTA-gema de ovo (D5) preservaram melhor ($P < 0,05$) a integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal dos espermatozoides do que os diluidores com uma menor concentração de açúcares e tampões (D2 e D4). Ficou evidente, assim, que, para os crioprotetores intracelulares e curvas de resfriamento utilizadas, a redução das quantidades de açúcares e tampões comprometeu a preservação da viabilidade espermática pós-descongelamento. Essa influência foi significativa quando da análise da integridade estrutural da membrana e mostrou uma tendência consistente nos outros parâmetros avaliados. Considerando a preservação da integridade das membranas como um sinal que as demais estruturas presentes na cabeça também seriam preservadas na mesma intensidade, como, por exemplo, o núcleo, que é importante no processo de fertilização, os diluidores que apresentaram menor concentração de crioprotetores extracelulares (D2 e D4) demonstraram pouco potencial para serem utilizados na criopreservação de sêmen equino. A queda da viabilidade pode ser consequência da queda da osmolaridade do diluidor, resultante da redução nas quantidades dos crioprotetores extracelulares.

Faz-se necessário ressaltar que a composição adequada de um diluidor seminal não depende, apenas, de uma adequada concentração de crioprotetores intracelulares e extracelulares, mas da combinação ideal das substâncias que são utilizadas, levando-se em consideração qual a melhor fonte de energia para os espermatozoides, as melhores substâncias não iônicas, o tipo de macromoléculas e a concentração e o tipo ideal de crioprotetor intracelular. Isso porque, segundo Keith (1998), a presença de determinados

açúcares, dependendo da concentração dessas substâncias nos diluidores de congelamento de sêmen equino, influiu negativamente sobre a viabilidade espermática.

Além dos açúcares (glicose e lactose), os diluidores utilizados no presente experimento continham diferentes concentrações de substâncias tampões (citrato de sódio, bicarbonato de sódio e EDTA). Essas substâncias estavam em menor concentração nos piores meios (D2 e D4). De acordo com Bogart e Mayer (1950), existe uma aparente associação entre o grau de ionização dos sais que compõem os diluidores e os efeitos deletérios destes sais sobre os espermatozoides. Dessa maneira, parece que a sobrevivência espermática durante o armazenamento em baixas temperaturas, aparentemente, está inversamente relacionada com o grau de ionização desses sais. Aqueles pesquisadores, ao compararem algumas substâncias tampões, verificaram que o citrato de Na tem o menor índice de ionização, sendo considerado ótimo agente tampão. Segundo Silva et al. (1996), agentes crioprotetores extracelulares como as substâncias tampões podem agir sinergicamente com os crioprotetores intracelulares, propiciando ambiente adequado aos espermatozoides durante a congelamento/descongelamento. Além disso, a atividade metabólica dos espermatozoides causa aumento na concentração de íons hidrogênio no meio extracelular. Caso não exista nenhum mecanismo de remoção desses íons, ocorre redução do pH do meio onde os espermatozoides se encontram, acarretando diminuição na longevidade e fertilidade dessas células (Smith, 1984, citado por England, 1993).

O EDTA, que está presente no diluidor lactose-gema, sendo um quelante de cálcio (Graham, 1996), reduz a concentração deste íon no ambiente extracelular, o que, provavelmente, pode contribuir para minimizar a entrada de cálcio nos espermatozoides. Durante a criopreservação, as membranas dos espermatozoides sofrem mudanças na fluidez, semelhantes às que ocorrem durante a capacitação natural, tornando-as permeáveis aos íons cálcio que promovem tanto a capacitação como a reação acrossômica. Esses dois eventos limitam a sobrevivência dos espermatozoides por tempo prolongado, porque, nesse estágio, os espermatozoides estão preparados para fertilizar

o ovócito e, quando a fertilização não acontece em um curto período de tempo, os espermatozoides não resistem e morrem (Watson, 1995). Pode também ter sido causa da queda na viabilidade espermática pós-descongelamento, encontrada nos diluidores D2 e D4, a inadequada proporção de citrato de Na, EDTA e bicarbonato de Na presente nesses meios.

O diluidor com alta concentração de açúcares, tampões e sais e 20% de gema mostrou potencial para proteção da característica integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal. Este achado é encorajador e abre uma janela para estudos complementares de avaliação do efeito da osmolaridade dos diluidores sobre a preservação da viabilidade espermática pós-descongelamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGOLA, A.P.; QUINTERO, L.Z. Efecto de la sustitución de yema de huevo por albúmina sérica bovina, suero equino o suero bovino en el diluyente de congelación sobre la viabilidad posdescongelación del espermatozoide equino. *Vet. Mexico*, v.27, p.221-227, 1996.
- BOGART, R.; MAYER, D.T. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoan viability. *J. Anim. Sci.*, v.9, p.143-152, 1950.
- BRAUN, J.; HOCHI, S.; OGURI, N. et al. Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Cryobiology*, v.32, p.487-492, 1995.
- BURNS, P.J. Modification of kenney's extender for cryopreservation of equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1992, Den Haag. *Proceedings...* Den Haag, 1992. p.1849-1851.
- BURNS, P.J.; REASNER, D.S. Computerized analysis of sperm motion: effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, v.15, p.377-380, 1995.
- CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F. et al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.*, v.242, p.1-10, 1987.
- ECOT, P.; VIDAMENT, M.; MONARC, A. et al. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *J. Reprod. Fertil.*, v.56, suppl., p.141-150, 2000.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen : a review. *J. Reprod. Fertil.*, v.47, suppl., p.243-255, 1993.
- GOMES, G.M.; PAPA, F. O.; JACOB, J.C.F. et al. Melhoria dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento com o meio MP 50 para sêmen de garanhões da raça mangalarga machador. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.26, p.187-189, 2002.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, v.12, p.131-145, 1996.
- GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2000. *Proceedings...* Stockholm, 2000. v.2, p.307.
- 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.
- JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, W.D. et al. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.37, p.1241-1252, 1992.
- JULIANI, G.C.; HENRY, M.; MIRON, D.M. et al. Congelamento de sêmen equino: efeito de diferentes crioprotetores e diluidores. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 29., 2002, Gramado, RS *Anais...* Gramado: Combravet, 2002.
- KEITH, S.L. *Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa*. 1998. 104f. Thesis (Master of Science) - Colorado State University, Colorado.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fertil.*, v.27, suppl., p.47-51, 1979.

- MANUAL para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 2.ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, 1998. p.25-27.
- MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T. et al. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, v.58, p.273-276, 2002.
- MELO, M.I.V; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.71-78, 1999.
- NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O.; LEME, D.P. Avaliação entre congelabilidade e fertilidade do sêmen equino frente a dois diluidores. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, p.301-302, 1999.
- PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10., 1984. *Proceedings...* Urbana, 1984. p.377.
- PAPA, F.O.; TAVARES, C.V.N.; MEIRA, C. et al. Glicina-gema: proposta de um novo diluidor para a congelação de sêmen bovino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10., 1993, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1993. p.313.
- PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'ÁQUA JÚNIOR, J.A. et al. Utilização do diluente MP 50 para a criopreservação de sêmen equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.26, p.184-187, 2002.
- PICKETT, B.W.; BERNDTSON, W.E. Principles and techniques of freezing spermatozoa. In: SALISBURY, G.E., VANDEMARK, J.R. (Eds.). *Physiology and reproduction and artificial insemination of cattle*. San Francisco: Freeman, 1978. p.494.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada a experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C.; CRABO, B.G.. Relationship between the fertility of fresh and frozen semen and semen quality. *J. Reprod. Fertil.*, v.44, suppl.,p.107-114, 1991.
- SILVA, AL.A.; YAMASAKI, R; DE SALA, M.M et al. The addition of fructose or sodium citrate does not improve recovery rates of cryopreserved human spermatozoa. *Int. J. Fertil.*, v.41, p.304-309, 1996.
- TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *J. Reprod. Fertil.*, v.27, suppl., p.53-59, 1979.
- SISTEMA de análise estatística e genética. Versão 6,0. SAEG. Viçosa, MG:UFV, 1997.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M. et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology*, v.58, p.249-251, 2002.
- VIDAMENT, M.; YVON, J.M.; COUTY, I. Et al. Advances in cryopreservation in modified INRA 82. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, p.201-218, 2001.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, p.871-891, 1995.
- ZÚCCARI, C.E.S.N. *Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina*. 1998. 121f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.