



## Adição de alanina, glicina e glutamina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador<sup>1</sup>

Bruno Fagundes<sup>2</sup>, José Frederico Straggiotti Silva<sup>2</sup>, Aldo Shimoya<sup>3</sup>, Isabel Candia Nunes da Cunha<sup>2</sup>, Guilherme Valente de Souza<sup>2</sup>, Maurício Fraga van Tilburg<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Projeto financiado pela Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes - RJ.

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense - Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal.

<sup>3</sup> Universidade Salgado de Oliveira – UNIVERSO, Campos - RJ.

**RESUMO** - Objetivou-se neste trabalho verificar o efeito da adição de alanina, glicina e glutamina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. Foram utilizados cinco garanhões provenientes do haras Lugavi. Três ejaculados de cada garanhão, após coleta e avaliação, foram divididos em seis tratamentos: sem adição de aminoácidos, adição de 40 mM de alanina, adição de 40 mM de glicina, adição de 60 mM de glutamina, adição de 7 mM de alanina + 7 mM de glicina + 20 mM de glutamina e adição de 40 mM de alanina + 40 mM de glicina + 60 mM de glutamina ao diluente de congelamento convencional. Foram avaliados os parâmetros motilidade total, motilidade progressiva, retidão, linearidade, velocidade média do percurso, velocidade linear, velocidade curvilínea, amplitude lateral de cabeça e frequência de batimentos dos espermatozoides por meio de análise espermática assistida por computador (CASA), funcionalidade da membrana plasmática por choque hiposmótico e integridade de membrana acrossomal pelo teste FITC-PSA. Não houve melhora nos parâmetros de motilidade e cinética espermática nem na funcionalidade de membrana, entretanto, a adição de aminoácidos ao meio crioprotetor seminal aumentou o número de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra. Os melhores resultados neste teste são obtidos com 40 mM de alanina ( $78,6 \pm 13,6$ ), 40 mM de glicina ( $74,7 \pm 19,6$ ) ou 7 mM de alanina + 7 mM de glicina + 20 mM de glutamina ( $76,8 \pm 17,5$ ), porém outros estudos devem ser realizados para determinação da concentração ideal desses componentes.

Palavras-chave: aminoácido, congelamento, equino, espermatozoide, membrana plasmática

## Addition of alanine, glycine and glutamine to frozen seminal extender from Mangalarga Marchador stallions

**ABSTRACT** - The objective of this study was to analyze the effect of the addition of alanine, glycine and glutamine on frozen seminal extender of Mangalarga marchador breed stallions. Five stallions were used from the Lugavi stables. Three ejaculates from each stallion were divided into six treatments: without the addition of amino acids, addition of 40 mM alanine, addition of 40 mM glycine, addition of 60 mM glutamine, addition of 7 mM glycine, alanine 7 mM + 20 mM glutamine and addition of 40 mM of glycine + 40 mM of alanine + 60 mM of glutamine to conventional frozen extender. The parameters evaluated were total motility, progressive motility, straightness, linearity, path velocity, progressive velocity, track speed, lateral amplitude and beat frequency by computer assisted sperm analysis (CASA), functionality of plasmatic membrane by hypo-osmotic shock and acrossomal membrane integrity by the FITC-PSA test. No improvement was found in the kinematic parameters and sperm motility and nor in membrane functionality but the addition of amino acids to seminal extender resulted in a higher integrity of the acrossomal membrane. The best results obtained in this test are with 40 mM alanine ( $78.6 \pm 13.6$ ), 40 mM glycine ( $74.7 \pm 19.6$ ) or 7 mM glycine, alanine 7 mM + 20 mM glutamine ( $76.8 \pm 17.5$ ), however, more studies should be conducted to reach the ideal concentration of these components.

Key Words: amino acid, equine, freezing, plasmatic membrane, sperm

### Introdução

A variação na congelabilidade seminal entre garanhões e entre ejaculados de um mesmo garanhão (Pickett & Amann, 1993) também ocorre entre raças, e a grande maioria dos garanhões Mangalarga Marchador é classificada como

maus congeladores quando se utiliza apenas glicerol como crioprotetor (Alvarenga et al., 1996; Gomes et al., 2002).

A avaliação de crioprotetores alternativos ao glicerol para preservação de espermatozoide equino tornou-se uma área de extensa investigação nos últimos anos. As amidas são componentes com peso molecular menor que

do glicerol e devem penetrar a membrana plasmática mais rapidamente (Squires 2005). A associação entre dimetilformamida e glicerol é mais efetiva que o uso desses crioprotetores separadamente (Vidament et al., 2002). Gomes et al. (2002) constataram que a dimetilformamida e a metilformamida melhoram a congelabilidade do sêmen de garanhões Mangalarga Marchador.

A eficácia de alguns aminoácidos na crioproteção celular é comprovada (Kruuv & Glofcheski, 1992). Kundu et al. (2001) obtiveram êxito no congelamento de espermatozoides caprinos utilizando apenas aminoácidos como crioprotetores e relataram que os melhores resultados foram obtidos com associação de 40 mM de alanina, 60 mM de glutamina, 20 mM de prolina ou 40 mM de glicina com glicerol e dimetilsulfóxido ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ). Desse modo, sugeriram que essa mistura de crioprotetores pode ser benéfica para a criopreservação de sêmen de várias espécies.

He & Woods (2003) também observaram melhor crioproteção utilizando alanina ou glicina associada ao  $\text{Me}_2\text{SO}$  em espermatozoides de peixe “baixo listrado” (*Morone saxatilis*). A glicina tem sido usada com sucesso como crioprotetor não-penetrante para criopreservar espermatozoides e aumentar a motilidade pós-descongelamento (Kundu et al., 2001; He & Woods 2003). He & Woods (2004b) observaram que a glicina protege a integridade da membrana plasmática espermática no pós-descongelamento. O mecanismo de ação da glicina é desconhecido. Khelifaoui et al. (2005) verificaram que a adição de 50 mM de glutamina mais 2,5% de glicerol aumenta a motilidade espermática equina em comparação a outros meios crioprotetores contendo apenas glicerol.

Este trabalho foi conduzido com a finalidade de verificar o efeito da adição de alanina, glicina e glutamina ao meio crioprotetor do sêmen de garanhões Mangalarga Marchador.

## Material e Métodos

Foram utilizados cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador provenientes do Haras Lugavi, em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro. Inicialmente foram realizadas cinco coletas de sêmen de cada garanhão a fim de eliminar células espermáticas armazenadas por um longo período. Em seguida, foram coletados três ejaculados de cada animal para realização deste trabalho. O intervalo entre as coletas foi de dois dias.

O sêmen foi obtido utilizando-se uma vagina artificial modelo Hannover com a temperatura de 42 °C, com uma

égua em cio como manequim. A porção gelatinosa proveniente das vesículas seminais foi removida ao ficar retida no filtro de coleta e a concentração espermática foi determinada com auxílio de uma câmara de Newbauer. Uma amostra do sêmen foi diluída na proporção de 1:200 de solução formol citrato preparada com 2,94 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada. Desta solução, 4 mL foram removidos e adicionados de 4 mL de formaldeído (Merck®). O sêmen foi diluído em meio de resfriamento contendo 10 g de leite desnatado Molico® (Nestle®) e 0,4 g de AGROVET® (Novartis®) diluídos em 100 mL de água destilada q.s.p. na proporção de uma parte de sêmen para duas de diluente. Em seguida, o sêmen foi centrifugado a 600 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Cerca de 10 a 20% do diluente de resfriamento com o plasma seminal foi preservado para ressuspensão com o diluente de congelamento. O diluente de congelamento utilizado foi o proposto por Vidament et al. (2002) com modificações, contendo 50 mL de lactose 11%; 25 mL de glicose-EDTA (12 g de glicose; 0,240 g de carbonato de sódio; 0,740 g de EDTA; 0,750 g de citrato de sódio 2  $\text{H}_2\text{O}$ ; 0,8 g de AGROVET® (Novartis®); 200 mL de água destilada q.s.p.); 20 mL de gema de ovo *in natura*; 3 mL de glicerol; 2 mL de dimetilformamida; 0,5 mL de Equex® - Farmacia, Orvus et paste. Todos esses reagentes foram obtidos pela empresa VETEC®.

A adição de aminoácidos (Sigma-Aldrich®) ao meio crioprotetor foi adaptada ao diluente de congelamento equino, conforme descrito por Kundu et al. (2001), utilizando-se 40 mM de alanina, 40 mM de glicina ou 60 mM de glutamina, testando-se também a redução na concentração desses aminoácidos para 7 mM de alanina + 7 mM de glicina + 20 mM de glutamina e uma associação de todas as concentrações ideais verificadas por Kundu et al. (2001) contendo 40 mM de alanina + 40 mM glicina + 60 mM de glutamina. Foram avaliados os parâmetros de motilidade e cinética espermática utilizando-se o programa Ceros, versão 10.8, da Hamilton Thorn Research (HTM-CEROS), de funcionalidade de membrana plasmática pelo teste hiposmótico (Dell’Aqua Jr. et al., 2001) e de integridade de membrana acrossomal pelo teste FITC-PSA.

Realizou-se a ressuspensão do sedimento de espermatozoides obtidos do mesmo ejaculado de um garanhão acrescentando o diluente de congelamento de acordo com os tratamentos supracitados, de forma a se obter concentração final de  $100 \times 10^6$  células/mL. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, que foram mantidas em repouso por 20 minutos a 4 °C e, depois, foram colocadas a 4 cm acima do nível do nitrogênio líquido por 10 minutos,

sendo, então, imersas no nitrogênio líquido para armazenamento.

A funcionalidade da membrana espermática foi avaliada por choque hiposmótico utilizando-se a técnica desenvolvida por Dell'Aqua Jr. et al. (2001) modificada. Em um tubo de 1,5 mL foram adicionados 190 µL de água bidestilada a 38 °C e 10 µL do sêmen descongelado, mantendo-se o material incubado por 5 minutos em banho-maria a 38 °C. Uma amostra desse material foi colocada sobre a lâmina recobrimo-a com uma lamínula para análise em microscópio de contraste de fase com aumento de 400X. Foram contadas 200 células espermáticas, considerando as células com membrana funcional aquelas que apresentaram a cauda enrolada e não-funcionais aquelas que permaneceram com a cauda esticada. A integridade do acrossoma foi avaliada utilizando-se a fluoresceína isotiocianato conjugada com a Lectina *Pisum sativum* aglutinina (FITC-PSA), a qual se liga a glicoconjugados da membrana acrossomal ou à matriz acrossomal (Bedford et al., 2000) em associação a iodeto de propídeo para melhorar o contraste da célula.

Após a análise da funcionalidade da membrana, da motilidade e da cinética espermática, o sêmen descongelado foi centrifugado a 200 x g por 2 minutos para remoção do diluente de congelamento e adição de tampão fosfato (PBS). Em seguida, foram preparados esfregaços das amostras, que foram secas à temperatura ambiente e mergulhadas em metanol resfriado a -10 °C no congelador por 30 segundos e novamente secas a temperatura ambiente. Sobre cada lâmina foram colocados 60 µL de FITC-PSA sob proteção de luminosidade, que, em seguida, foram cobertos com um pedaço de transparência para retroprojeção e incubados por 20 minutos. Em seguida, 60 µL de iodeto de propídeo foram adicionados em cada lâmina, a qual foi novamente foi coberta com um pedaço de transparência para retroprojeção e incubada por 10 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS e cobertas com lamínula para observação em microscópio com ultravioleta (UV) com aumento de 1000X. Foram contadas 200 células por lâmina e classificadas como acrossoma íntegro (verde uniforme), parcialmente reagido (*balloon* ou danificado) e reagido (vermelho). O comprimento de onda utilizado na observação foi de 540 nm, e todos os reagentes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Os parâmetros de motilidade e cinética espermática foram determinados por avaliação computadorizada utilizando-se o programa Ceros, versão 10.8, da *Hamilton Thorne Research* (HTM-CEROS, 1999). Uma câmara de contagem de 20 µL (Hamilton Thorne Research) pré-aquecida pela placa de platina aquecedora ( $\pm 37$  °C) foi

utilizada para observação da amostra seminal em microscópio ótico com aumento de 100 vezes acoplado ao computador. A intensidade da fonte de luz foi ajustada para que as imagens dos espermatozoides fossem capturadas e digitalizadas para análise pelo programa.

Foram escolhidos quatro campos que apresentavam melhor motilidade aparente na amostra para submissão à análise; a média desses valores foi anotada e salva no programa para análise estatística. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os tratamentos comparados pelo teste F. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade e as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional Genes (Cruz, 2006).

Para determinação da composição de aminoácidos no diluente controle (Tabela 1), u ma amostra de 20 µL desse diluente previamente diluído dez vezes foi aplicada em coluna de troca iônica (Amino-Na) utilizando-se o analisador de aminoácidos “Shimadzu *High-Performance Liquid Chromatograph* (HPLC) – *Amino Acids Analysis System*”, segundo metodologia descrita no manual de instruções desse equipamento, utilizando-se comprimento de onda de 348 nm na excitação de 450 nm na emissão.

Tabela 1 - Composição em aminoácidos no diluente Vidament et al. (2002) modificado

Aminoácido	Concentração (mM)
Ácido aspártico	0,0981
Glutamina+treonina	0,4614
Serina	0,2486
Ácido glutâmico	0,1655
Prolina	0,1545
Glicina	0,0635
Alanina	0,1052
Valina	0,1557
Metionina	0,0435
Isoleucina	0,1534
Leucina	0,1917
Tirosina	0,0686
Fenilalanina	0,1288
Histidina	0,3131
Lisina	0,1900
Arginina	0,1661

## Resultados e Discussão

Nos diluentes contendo 40 mM de alanina, 40 mM de glicina ou 7 mM de alanina + 7 mM de glicina + 20 mM de glutamina, observou-se motilidade espermática total superior à daqueles com 60 mM de glutamina e 40 mM de alanina + 40 mM de glicina + 60 mM de glutamina. Nos grupos controle e com adição de 60 mM de glutamina, a motilidade total foi superior à obtida com adição de 40 mM

de alanina + 40 mM de glicina + 60 mM de glutamina. A motilidade progressiva observada no grupo controle e naquele com adição de 7 mM de alanina + 7 mM de glicina + 20 mM de glutamina foi superior à dos tratamentos em que foram adicionados 60 mM de glutamina ou 40 mM de alanina + 40 mM de glicina + 60 mM de glutamina. Esse último grupo foi o que apresentou os valores mais baixos para todos os parâmetros de motilidade espermática (Tabela 2).

O efeito deletério da adição de 40 mM de alanina + 40 mM de glicina + 60 mM de glutamina sobre os espermatozoides criopreservados pode estar relacionado à toxicidade provocada pela alta concentração de aminoácidos durante o processo de congelamento e descongelamento, também observada em espermatozoides de carneiros (Sanchez-partida et al., 1992), jumentos (Trimeche et al., 1996), cavalos (Trimeche et al., 1999) e homens (Renard et al., 1996). Essa toxicidade pode ter sido causada pelo efeito osmótico (Kruuv et al., 1988; Trimeche et al., 1999; Fahy et al., 1990), uma vez que esse meio apresentou a osmolaridade de 581 mOsm, enquanto o diluente convencional apresentou a osmolaridade de 358 mOsm. Entretanto, a hipótese de toxicidade bioquímica não pode ser descartada (Trimeche et al., 1996) e ambas as hipóteses podem atuar em conjunto (Fahy et al., 1990).

A associação benéfica na motilidade espermática entre crioprotetores e aminoácidos constatada em equinos (Khelifaoui et al., 2005) e em outras espécies (Kundu et al., 2001; He & Woods 2003) não ficou evidenciada neste trabalho, possivelmente porque não foi reduzido o volume dos crioprotetores descritos por Vidament et al. (2002),

enquanto Khelifaoui et al. (2005) reduziram o volume do glicerol, o qual não estava associado com dimetilformamida, para adição de glutamina. É possível que a concentração dos aminoácidos idealizada por Kundu et al. (2001) não seja a mesma para utilização com o meio proposto por Vidament et al. (2002) contendo glicerol e dimetilformamida com o objetivo de melhorar os parâmetros de motilidade espermática.

Assim como na análise de motilidade, a adição de 40 mM de alanina + 40 mM de glicina + 60 mM de glutamina prejudicou todos os parâmetros cinemáticos analisados. A adição de 60 mM de glutamina também teve efeito deletério na análise da velocidade média do percurso e da velocidade linear em relação à adição de 40 mM de alanina ou 40 mM de glicina ou 7 mM de alanina + 7 mM de glicina + 20 mM de glutamina ou ao tratamento em que não foi adicionado nenhum aminoácido (Tabela 3).

Rathi et al. (2001) postularam que a amplitude lateral da cabeça e a velocidade curvilínea aumentam em espermatozoides equinos hiperativados em meio contendo agentes capacitantes como: bicarbonato e  $Ca^{2+}$  ionóforo. Esses autores concluíram que espermatozoides equinos hiperativados apresentam  $VCL \geq 180$  e  $ALH \geq 12$ . De acordo com esses valores, a adição dos aminoácidos não induziu a capacitação espermática.

Mortimer (1997) reportou que o aumento na viscosidade do diluente diminui a amplitude da onda flagelar. Geralmente amplitude lateral de cabeça elevada não é desejável porque afeta a progressão celular, desse modo valores mais elevados de amplitude lateral de cabeça

Tabela 2 - Motilidade espermática imediatamente após o descongelamento do sêmen de ganhões criopreservado com alanina, glicina e glutamina

Aminoácido	Motilidade total (%)	Motilidade progressiva (%)	Retidão (%)	Linearidade
0 (Controle)	31,6 ± 18,0ab	19,8 ± 12,0a	78,3 ± 3,6a	45,2 ± 3,7a
40 mM alanina	32,5 ± 16,6a	17,8 ± 10,8ab	76,2 ± 4,6a	44,7 ± 3,9a
40 mM glicina	31,9 ± 16,7a	18,2 ± 11,2ab	76,6 ± 4,6a	45,2 ± 4,2a
60 mM glutamina	26,0 ± 16,3b	13,9 ± 11,1b	74,0 ± 4,4a	43,0 ± 4,2ab
7 alanina e glicina e 20 glutamina	34,8 ± 21,1a	20,2 ± 14,4a	76,4 ± 4,7a	44,6 ± 4,1a
40 alanina e glicina e 60 mM glutamina	7,4 ± 7,5c	2,8 ± 3,8c	67,6 ± 16,2b	40,1 ± 10,8b

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey.

Tabela 3 - Cinética espermática imediatamente após o descongelamento do sêmen de ganhões criopreservado em meio com alanina, glicina e glutamina

Aminoácido	VAP ( $\mu$ m/s)	VSL ( $\mu$ m/s)	Velocidade curvilínea ( $\mu$ m/s)	Amplitude lateral da cabeça ( $\mu$ m)	BCF (Hz)
0 (controle)	55,9 ± 11,1a	44,3 ± 9,4a	92,0 ± 27,5a	5,2 ± 0,6a	22,3 ± 6,4a
40 mM alanina	52,6 ± 7,9a	40,4 ± 7,2a	92,3 ± 12,8a	5,4 ± 0,7a	20,1 ± 6,8a
40 mM glicina	53,2 ± 11,4a	41,2 ± 9,9a	92,1 ± 18,0a	5,4 ± 0,8a	19,6 ± 6,3a
60 mM glutamina	47,2 ± 12,1b	35,2 ± 10,1b	83,6 ± 21,5a	4,8 ± 1,5a	20,2 ± 7,3a
7 alaninae glicina 20 glutamina	52,9 ± 10,3a	40,8 ± 8,4a	93,6 ± 17,2a	5,3 ± 0,7a	21,1 ± 6,2a
40 alanina e glicina 60 glutamina	39,6 ± 12,9c	28,1 ± 11,5c	67,8 ± 23,0b	4,0 ± 1,8b	15,8 ± 6,3b

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey.

denotam menor qualidade da amostra seminal (Arruda et al., 2003). A adição de 40 mM de alanina + 40 mM de glicina + 60 mM de glutamina apresentou o menor valor de amplitude lateral de cabeça, porém esse fato não denota qualidade seminal elevada, pois os valores de motilidade e velocidade espermática também foram baixos e esses fatores apresentam correlação fortemente positiva com a fertilidade (Kathiravan et al., 2008).

A adição de 40 mM de alanina ou 40 mM de glicina ou 7 mM de alanina + 7 mM de glicina + 20 mM de glutamina resultaram em maior integridade de membrana acrossomal, enquanto o tratamento que utilizou 40 mM de alanina + 40 mM de glicina + 60 mM de glutamina apresentou menor funcionalidade de membrana e maior porcentagem de espermatozoides com acrossomas lesados, juntamente com o grupo em que não foram adicionados aminoácidos (Tabela 4).

He & Woods (2004a) observaram que a glicina protege a mitocôndria e seu conteúdo de ATP, mas não protege a integridade da membrana plasmática espermática pós-descongelamento. Mesmo não melhorando a funcionalidade da membrana plasmática, a adição de 40 mM de alanina ou 40 mM de glicina ou 7 mM de alanina + 7 mM de glicina + 20 mM de glutamina melhorou a integridade de membrana acrossomal, o que indica efeito protetor desses aminoácidos nestas concentrações utilizadas. Apesar dos maiores valores de funcionalidade de membrana plasmática, assim como a grande maioria dos grupos em que foram adicionados aminoácidos, a não-adição de aminoácidos resultou em menor proteção da integridade acrossomal.

Apesar de ter sido verificado o efeito crioprotetor sobre espermatozoides em diversas espécies (Sanchez-Partida et al., 1992; Renard et al., 1996; Trimeche et al., 1999; Kundu et al., 2001; He & Woods 2003, 2004a, b), os mecanismos de crioproteção espermática por aminoácido, assim como a função de aminoácidos livres na fisiologia do espermatozoide, ainda não foram esclarecidos.

Tabela 4 - Análise de membranas funcionais (hiposmótico) e integridade acrossomal sob o efeito da adição de alanina, glicina e glutamina

Aminoácido	Hiposmótico	PSA
0 (controle)	30,1 ± 11,2a	68,2 ± 15,5d
40 mM alanina	29,5 ± 10,4a	78,6 ± 13,6a
40 mM glicina	31,3 ± 11,0a	74,7 ± 19,6abc
60 mM glutamina	26,2 ± 12,5a	73,3 ± 14,9bc
7 mM alanina e glicina + 20 mM glutamina	28,8 ± 11,2a	76,8 ± 17,5ab
40 mM alanina e glicina + 60 mM glutamina	18,6 ± 10,6b	69,6 ± 19,0cd

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey.

Kundu et al. (2001) especularam ser possível os aminoácidos interagirem eletrostaticamente com grupos fosfato de fosfolípidos na membrana plasmática do espermatozoide, formando desse modo uma camada protetora na superfície espermática.

## Conclusões

A adição de aminoácidos no meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador não melhora de forma significativa os parâmetros de motilidade e cinética espermática nem na funcionalidade de membrana, mas promove maior integridade de membrana acrossomal. Os melhores resultados são obtidos com 40 mM de alanina, 40 mM de glicina ou 7 mM de alanina + 7 mM de glicina + 20 mM de glutamina. Novos estudos devem ser realizados para determinar a concentração ideal desses componentes e elucidar o mecanismo de crioproteção desses aminoácidos, que permanece desconhecido.

## Agradecimentos

À Universidade Estadual do Norte Fluminense, pela concessão de bolsa para estudos, e ao Laboratório de Química e Funções de Proteínas e Peptídeos da UENF, em especial à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Olga Lima Tavares, pela disposição de espaço físico e equipamentos.

## Referências

- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JR., J. The effect of breeds spermatic parameters over equine semen freezability. In: SYMPOSIUM OF STALLION SEMEN, 1996, Amersfoort The Netherlands. **Proceedings...** Amersfoort, 1996. p.82.
- ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Evaluation of effects of extenders and cryoprotectants on equine spermatozoa using computer-assisted sperm analyses (CASA) and flow cytometry. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.228-229, 2003.
- BEDFORD, S.J.; VARNER, D.D.; MEYERS, S.A. Effects of cryopreservation on the acrossomal status of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.56, p.133-140, 2000.
- CRUZ, C.D. **Programa GENES**: estatística experimental e matrizes. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. 285p.
- DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. et al. Effect of packing systems and thawing temperature on spermatic parameters and fertility rate of frozen equine semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.458-460, 2001.
- FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H. et al. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v.27, p.247-268, 1990.
- GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L. et al. Improvement of stallion spermatozoa with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.

- HE, S.; WOODS III, L.C. Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxalitis*) spermatozoa. **Cryobiology**, v.46, p.17-25, 2003.
- HE, S.; WOODS III, L.C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxalitis*) sperm. **Cryobiology**, v.48, p.254-262, 2004a.
- HE, S.; WOODS III, L.C. Changes in motility, ultrastructure, and fertilization capacity of striped bass *Morone saxatilis* spermatozoa following cryopreservation. **Aquaculture**, v.236, p.677-686, 2004b.
- KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M.J. et al. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.9-17, 2008.
- KHLIFAOU, M.; BATTUT, I.; BRUYAS, J.F. et al. Effects of glutamine on post-thaw motility of stallions spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. **Theriogenology**, v.63, p.138-149, 2005.
- KRUUV, J.; GLOFCHESKI, D.J. Protective effect of amino acids against freeze-thaw damage in mammalian cells. **Cryobiology**, v.29, p.291-295, 1992.
- KRUUV, J.; GLOFCHESKI, D.J.; LEPOCK, J.R. Protective effect of l-glutamine against freeze-thaw damage in mammalian cells. **Cryobiology**, v.25, p.121-130, 1988.
- KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUMDER, G.C. Effect of amino acids on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system **Cryobiology**, v.41, p.21-27, 2001.
- MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, p.403-439, 1997.
- PICKETT, B.W.; AMANN R.P. Cryopreservation of semen. In: **Equine reproduction**. McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds.) Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.769-789.
- RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. et al. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.65, p.462-470, 2001.
- RENARD, P.; GRIZARD, G.; GRIVEAN, I.F. et al. Improvement of motility and fertilization potential of post-thaw human sperm using amino acids. **Cryobiology**, v.33, p.311-319, 1996.
- SANCHEZ-PARTIDA, L.G.; MAXWELL, W.M.C.; PALEG, L.G. et al. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v.4, p.113-118, 1992.
- SQUIRES, E.L. Integration of future biotechnologies into the equine industry. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.187, 2005.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LE LANNOU, D. et al. Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. **Theriogenology**, v.45, p.1015-1027, 1996.
- TRIMECHE, A.; YVON, J.M.; VIDAMENT, M. et al. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.52, p.181-191, 1999.
- 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.