

SANDRA CRISTINA BECKER-SILVA

**Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes**

São Paulo

2004

SANDRA CRISTINA BECKER-SILVA

**Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária

**Departamento:**  
Reprodução Animal

**Área de Concentração:**  
Reprodução Animal

**Orientador:**  
Prof. Dr. Francisco Gacek

**Co-orientador:**  
Prof. Dr. Wolfgang Holtz (Georg-August-Universität-Göttingen)

São Paulo

2004

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BECKER-SILVA, Sandra Cristina

Título: Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Dedico esta tese

A meus pais  
Argentino Silva e Odete Becker,  
presença constante mesmo quando imensas distâncias nos separaram

À natureza e ao amor de Deus  
Minhas eternas fontes de inspiração

## AGRADECIMENTOS

À equipe de trabalho do Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik da Universidade Georg-August em Goettingen, Alemanha, em especial a Birgit, Nicole, Dieter e Joham. Este trabalho só foi possível graças à ajuda de vocês.

Aos amigos da pós, do Brasil e de além-mar, sempre dispostos a oferecer um ombro amigo ou um conselho pertinente: Kamazu, Wolf, Leandro, Marina, Wagdy, Abdulaie, Morten, Frieder... Recebam um grande obrigado.

Aos amigos, tantos e de tantas cores e rostos e que trouxeram sempre luz e calor aos meus dias. Levo eternamente comigo o que aprendi com vocês.

Ao Dr. Raimundo Pereira (Embriocom - Pernambuco), por permitir que eu conduzisse pré-experimentos em seu laboratório e por ajudar a construir a ponte que me levou à Alemanha.

À professora Judith Reischl pela inestimável ajuda na correção de meu trabalho.

Às secretárias do VRA e da Pós-graduação, pela paciência e tratamento atencioso.

Às funcionárias da biblioteca, pelo auxílio na referência bibliográfica.

Aos professores da pós-graduação, por sua contribuição à minha formação profissional e pessoal.

Ao meu orientador, Professor Dr. Francisco Gacek, sua serenidade e presença ponderada foram um porto seguro e fonte inesgotável de exemplo.

Ao meu Co-orientador, Professor Dr. Wolfgang Holtz, a experiência de trabalhar em seu laboratório e de acompanhar sua maneira de fazer ciência contribuíram muito para meu amadurecimento acadêmico.

Aos professores da banca, o meu agradecimento antecipado pelas contribuições ao meu trabalho.

À Universidade de São Paulo, por me acolher como estudante de pós-graduação e me oferecer um ambiente acadêmico tão estimulante.

Ao Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik da Universidade Georg-August em Goettingen, Alemanha, por oferecer todas as condições necessárias para que este trabalho pudesse ser concluído com êxito.

Ao DAAD, por me conceder a bolsa de doutorado sanduíche e me prover de toda assistência durante minha estadia na Alemanha.

À Referat do DAAD, Frau Maria Salgado, pela gentileza com que sempre me atendeu.

\*\*\*\*\*

"Quando renunciamos aos nossos sonhos e encontramos a paz, temos um pequeno período de tranquilidade. Mas os sonhos mortos começam a apodrecer dentro de nós e a infestar todo o ambiente em que vivemos. O que queríamos evitar no combate - a decepção e a derrota - passa a ser o único legado de nossa covardia".

*Paulo Coelho*

Eu continuo preferindo o combate

## RESUMO

BECKER-SILVA, S. C. **Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes.** [Tolerance limits of goat spermatozoa to hyperosmotic sucrose solutions and survival rate after cryopreservation in extenders containing sucrose or trehalose and reduced concentrations of permeant cryoprotectants]. 2004. 122 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Foi conduzida uma série de experimentos onde se buscou definir: 1) o limite de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose; 2) um diluente para criopreservação de sêmen que minimizasse as flutuações de volume celular. O limite de tolerância da membrana, avaliado pelo corante eosina-nigrosina, foi de 930 mOsm em soluções de sacarose em Ringer-lactato a 38°C. Os danos à integridade de membrana (IM), em osmolalidades acima deste valor, se estabeleceram no primeiro minuto de exposição e não se agravaram até 10 minutos depois. A motilidade (MOT) foi mais afetada que a IM. A rediluição abrupta em meio isosmótico causou dano extenso e proporcional ao grau de desidratação prévia. Nos experimentos seguintes, adição de 375 mM de sacarose ao diluidor TRIS-gema com 6,8% de glicerol (TGG), 5 minutos antes da congelação, resultou em MOT e IM similares ao controle TGG sem sacarose. Descongelação e rediluição a 4°C favoreceram a MOT e, a 38°C, favoreceram a IM. O diluente TRIS-gema com 375 mM de sacarose e concentração de glicerol reduzida para 1,7% apresentou melhor MOT e IM que o controle (65% e 187% vs 52% e 100%, respectivamente). A MOT após 2 h e o vigor após 6 h foram maiores quando a rediluição pós-descongelação foi em 5 passos se comparado a 3 passos (28% e 9% vs 19% e 2%, respectivamente). Na fase seguinte do trabalho, diluentes elaborados com 300 mM

de sacarose e 3,4% de glicerol e rediluídos em 5 passos a 20°C proporcionaram, após 6 h a 38°C, melhor MOT e vigor que o controle (33% e 26% vs 15% e 10%, respectivamente). A descongelação a 20°C favoreceu a MOT e o vigor nos tempos zero, 2 h e 6 h pós-descongelação em todos os grupos contendo sacarose. O etilenoglicol não diferiu do glicerol na concentração de 3,4% quando adicionado a diluente contendo 300 mM de sacarose. Nestes diluentes, a rediluição em 5 passos a 20°C não diferiu em MOT e IM da feita em 1 passo a 38°C. No último experimento, sêmen congelado em diluente contendo 300 mM de trealose e zero% de glicerol mostrou melhor IM após descongelação em um passo a 38°C (320% vs 100% no controle) e maior MOT às 6 h após descongelação e rediluição em 5 passos a 20°C (56% vs 26% no controle). Conclui-se que o sêmen caprino tolera soluções de sacarose até o limite de 930 mOsm, mas a rediluição deve ser progressiva. A desidratação parcial, causada por soluções concentradas de sacarose ou trealose, permite a congelação de sêmen sem adição de crioprotetores permeantes. Os melhores resultados foram obtidos em diluente TRIS-gema sem glicerol e adicionado de 300 mM de trealose.

Palavras-chave: Caprinos. Sêmen animal. Criopreservação. Sacarose.



## ABSTRACT

BECKER-SILVA, S. C. **Tolerance limits of goat spermatozoa to hyperosmotic sucrose solutions and survival rate after cryopreservation in extenders containing sucrose or trehalose and reduced concentrations of permeant cryoprotectants.** [Limites de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e taxa de sobrevivência após criopreservação em diluentes contendo sacarose ou trealose e concentrações reduzidas de crioprotetores permeantes]. 2004. 122 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The objective of this study was to: 1) define the tolerance limits of goat sperm to hyperosmotic sucrose solutions; 2) establish an extender that minimizes cell volume variations during the processes of freezing and thawing. Boer goat semen was diluted with Ringer-lactate-Sucrose solutions at 38°C. The hyperosmotic tolerance limit was 930 mOsm evaluated with eosin-nigrosin stain. At osmolalities above this value, damage was evident after 1 min and was not affected by further exposure. Redilution in a single step resulted in massive membrane damage that was nearly proportional to the dehydration intensity previously undergone. Motility (MOT) was more distinctly impaired than membrane integrity (MI). In the next experiments, addition of 375 mM sucrose (Suc) 5 min previous to freezing to TRIS-egg yolk extender containing 6.8% glycerin (TYG) resulted in sperm motility (MOT) and MI similar to control extender TYG without sucrose. Thawing and redilution at 4°C affected favorably the MOT, and at 38°C, was favorable to MI. When freezing in TRIS-egg yolk-Suc extenders with low glycerin concentration (1.7%) MOT and MI were significantly higher than in the control TYG (65% and 187% vs 52% and 100%, respectively). MOT 2 h after thawing and intensity of motility (INTMOT) after 6 h after thawing were better preserved after a redilution of 5 increasing volume-steps than after redilution of 3 steps (28% and 9% vs 19% and 2%, respectively). In sequence,

extenders containing 300 mM sucrose and thawed-rediluted 5 steps at 20°C improved MOT and INTMOT after 6 h (33% and 26% vs 15% and 10% in the control Group). The thawing-redilution at 20°C improved the results in all groups containing sucrose. At a concentration of 3.4% added to TRIS-yolk extender with 300 mM sucrose, the cryoprotectant ethylene glycol gave similar results as glycerin. MOT and INTMOT in the different time intervals were not influenced by redilution in 5 steps at 20°C or in one step at 38°C. In the last experiment made, semen frozen in a TRIS-yolk extender with 300 mM trehalose and devoid of glycerin showed the best MI after thawing-redilution in 1 step at 38°C (320% vs 100% in the control Group). The highest MOT after 6 h incubation was observed when this group was thawed-rediluted at 20°C in 5 steps (56% vs 26% in the control). From the results obtained it may be concluded that the upper tolerance limit of goat spermatozoa to hyperosmotic sucrose solutions is 930 mOsm. The redilution and return to isosmolality should be stepwise made. Goat semen can be frozen in extenders devoid of permeant cryoprotectants like glycerin when, previous to freezing, the cells are partially dehydrated by concentrated sucrose or trehalose solutions. The best survival rate was obtained when freezing goat spermatozoa in a glycerin-free TRIS-yolk-extender containing 300 mM of trehalose.

Key words: Goat. Animal semen. Cryopreservation. Sucrose.

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1.1 - Percentuais de motilidade e integridade de membrana avaliados 30 min após exposição de espermatozóides caprinos a soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato e 30 min após a rediluição em Ringer-lactato e retorno à condição isosmótica. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003 .....	55
Tabela 2.1 - Percentual de integridade de membrana de espermatozóides caprinos após exposição por 1, 2, 5 e 10 min a soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato a 38°C. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003.....	58
Tabela 3.1 - Percentual de motilidade pós-descongelamento e rediluição de espermatozóides caprinos congelados em AndroMed contendo três diferentes concentrações de sacarose. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003 .....	59
Tabela 4.1 - Motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozóides caprinos congelados após 2, 5 e 10 min de exposição ao diluidor TRIS-gema-glicerol contendo 375 mM de sacarose e descongelados e rediluídos a 4 e 38°C. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003 ...	60
Tabela 4.2 - Motilidade, vigor e integridade de membrana pós-descongelamento e rediluição de espermatozóides caprinos congelados após 2, 5 e 10 min de exposição ao diluidor TRIS-gema-glicerol contendo 375 mM de sacarose - Excluído o efeito da temperatura de descongelamento. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003 .....	62
Tabela 4.3 - Motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozóides caprinos congelados em diluidor TRIS-gema-glicerol contendo 375 mM de sacarose após-descongelamento e rediluição a 4 e a 38°C - Excluído o efeito do tempo de exposição à sacarose. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003 .....	63

<p>Tabela 5.1 - Motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozóides caprinos após descongelação e motilidade e vigor após 2 e 6 h de incubação a 38°C - Efeito de três diferentes concentrações de glicerol (1,7, 3,4 e 6,8%) adicionadas ao diluente TRIS-gema contendo 375 mM de sacarose, comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha, 2003.....</p>	65
<p>Tabela 6.1 - Motilidade, vigor e integridade de membrana após descongelação e motilidade e vigor após 2 e 6 h de incubação a 38°C de espermatozóides caprinos congelados em diluente TRIS-gema contendo 375 mM de sacarose e 1,7 a 6,8% de glicerol e descongelados e rediluídos a 4°C em três diferentes velocidades de rediluição: cinco passos baseados no volume (RBV-5), cinco passos de 120 mOsm de redução na osmolalidade (R-5) e três passos de 200 mOsm de redução na osmolalidade (R-3). Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha, 2003 .....</p>	69
<p>Tabela 7.1 - Motilidade, integridade de membrana e vigor após descongelação, motilidade após 2 h e motilidade e vigor após 6h de incubação a 38°C de espermatozóides caprinos - Efeito da congelação em meio TRIS-gema adicionado de duas diferentes concentrações de sacarose (375 e 300 mM) e de glicerol (1,7 e 3,4%), e da descongelação e rediluição em duas diferentes temperaturas (4 e 20°C) e velocidades de rediluição (RBV-5 e R-2), comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha, 2004 ....</p>	71
<p>Tabela 8.1 - Motilidade, IM e vigor de sêmen caprino congelado em meio TG contendo sacarose adicionado de glicerol ou etilenoglicol, e descongelado e rediluído em cinco passos (RBV-5) a 20°C ou em um passo (R-1) a 38°C. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2004 .....</p>	75
<p>Tabela 9.1 - Motilidade, IM e vigor de sêmen caprino congelado em meio TRIS-gema contendo 300 mM de sacarose adicionado ou não de 3,4% de glicerol, ou contendo 300 mM de trealose sem adição de glicerol, e descongelado e rediluído em cinco passos (RBV-5) a 20°C ou em um passo (R-1) a 38°C. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2004 ...</p>	77

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

Figura 1.1 - Motilidade avaliada 30 min após exposição de espermatozóides caprinos a soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato e 30 min após a rediluição em Ringer-lactato e retorno à condição isosmótica - Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha – 2003 .....	55
Figura 1.2 - Integridade de membrana avaliada 30 min após exposição de espermatozóides caprinos a soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato e 30 min após a rediluição em Ringer-lactato e retorno à condição isosmótica - Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha – 2003..	56
Figura 2.1 - Percentual de integridade de membrana de espermatozóides caprinos após exposição por 1, 2, 5 e 10 min a soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato a 38°C - Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha – 2003.....	57
Figura 4.1 - Motilidade de espermatozóides caprinos congelados após 2, 5 e 10 min de exposição ao diluidor TRIS-gema-glicerol contendo 375 mM de sacarose e descongelados e rediluídos a 4 e 38°C - Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha – 2003 .....	61
Figura 4.2 - Integridade de membrana de espermatozóides caprinos congelados após 2, 5 e 10 min de exposição ao diluidor TRIS-gema-glicerol contendo 375 mM de sacarose e descongelados e rediluídos a 4 e 38°C - Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha – 2003 .....	61
Figura 5.1 - Motilidade de espermatozóides caprinos pós-descongelação - Efeito de três diferentes concentrações de glicerol (1,7, 3,4 e 6,8%) adicionadas ao diluente TRIS-gema contendo 375 mM de sacarose, comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha – 2003 .....	66

- Figura 5.2 - Integridade de membrana de espermatozóides caprinos pós-descongelamento - Efeito de três diferentes concentrações de glicerol (1,7, 3,4 e 6,8%) adicionadas ao diluente TRIS-gema contendo 375 mM de sacarose, comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha – 2003 ..... 66
- Figura 7.1 - Integridade de membrana de espermatozóides caprinos pós-descongelamento - Efeito da congelamento em meio TRIS-gema adicionado de duas diferentes concentrações de sacarose (375 e 300 mM) e de glicerol (1,7 e 3,4%), e da descongelamento e rediluição em duas diferentes temperaturas (4 e 20°C) e velocidades de rediluição (RBV e R-2), comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha – 2004 ..... 72
- Figura 7.2 - Motilidade de espermatozóides caprinos pós-descongelamento - Efeito da congelamento em meio TRIS-gema adicionado de duas diferentes concentrações de sacarose (375 e 300 mM) e de glicerol (1,7 e 3,4%), e da descongelamento e rediluição em duas diferentes temperaturas (5 e 20°C) e velocidades de rediluição (RBV-5 e R-2), comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha – 2004 ..... 72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

And	AndroMed
cm	Centímetro
DMSO	Dimetil sulfóxido
g	Gramma
Gly	Glicerol
H	Hidrogênio
h	Hora
IA	Inseminação artificial
IM	Integridade de membrana
kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	miliMolar
mOsm	Miliosmol
MOT	Motilidade
n.	Número
NaCl	Cloreto de sódio
p.	Página
qsp	Quanto seja preciso (para completar o volume necessário)
R-1	Rediluição em passo único
R-2	Rediluição em 2 passos em que, a cada passo, a osmolalidade do meio decresce 300 mOsm
R-3	Rediluição em 3 passos em que, a cada passo, a osmolalidade do meio decresce 200 mOsm
R-5	Rediluição em 5 passos em que, a cada passo, a osmolalidade do meio decresce 120 mOsm

RBV-5	Rediluição Baseada no Volume em cinco passos crescentes de adição do rediluidor (125 µl; 125 µl; 250 µl; 500 µl; 750 µl)
RL	Ringer-lactato
S	Segundo
Sac	Sacarose
TG	TRIS-gema
Tg	Temperatura de vitrificação
TGG	TRIS-gema-glicerol
Tm	Temperatura de transição de fase dos lipídios da membrana (transição da fase líquido-cristalina para fase gel-sólida)
Trea	Trealose
UI	Unidades Internacionais
v.	Volume
VIG	Vigor
vs	<i>Versus</i>
µl	Microlitro



## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
=	Igual
>	Maior que
≤	Menor ou igual a
°C	Graus Celsius

---

## SUMÁRIO

---

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	25
2.1	A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL NA ESPÉCIE CAPRINA .....	25
2.2	EFEITOS DO RESFRIAMENTO E DA CONGELAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES .....	29
2.3	CRIOPROTETORES PERMEANTES E NÃO-PERMEANTES .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	37
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
4.1	ANIMAIS E MANEJO .....	38
4.2	COLHEITA E ANÁLISE DO SÊMEN .....	38
4.3	SOLUÇÕES E REAGENTES .....	39
4.4	DILUIÇÃO E PROCESSAMENTO DO SÊMEN – DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS .....	40
4.4.1	<b>Experimento 1 – Motilidade e integridade de membrana de espermatozóides caprinos após exposição a diferentes soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato e após retorno abrupto à isosmolalidade</b> .....	40
4.4.2	<b>Experimento 2 – Efeito da osmolalidade e do tempo de incubação em soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato sobre a integridade de membrana de espermatozóides caprinos</b> .....	42
4.4.3	<b>Experimento 3 – Efeito da adição de diferentes concentrações de sacarose ao meio diluidor AndroMed sobre a motilidade de espermatozóides caprinos após descongelação e rediluição</b> .....	43
4.4.4	<b>Experimento 4 – Efeito do tempo de exposição ao diluidor TRIS-gema-glicerol adicionado de 375 mM de sacarose e da temperatura de descongelação sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozóides caprinos</b> .....	45

4.4.5	<b>Experimento 5 – Efeito da congelação em meio TRIS-gema contendo sacarose (375 mM) e concentrações reduzidas de glicerol sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozóides caprinos .....</b>	46
4.4.6	<b>Experimento 6 – Efeito da velocidade de rediluição pós-descongelação sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana de sêmen caprino congelado em diluente TRIS-gema contendo sacarose (375 mM) e concentrações reduzidas de glicerol .....</b>	48
4.4.7	<b>Experimento 7 – Efeito da congelação em meio TRIS-gema contendo concentrações reduzidas de sacarose e de glicerol, e da temperatura e velocidade de rediluição pós-descongelação sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozóides caprinos.....</b>	49
4.4.8	<b>Experimento 8 – Efeito da congelação em meio TRIS-gema contendo 300 mM de sacarose e 3,4% de glicerol ou etilenoglicol, seguida de descongelação e rediluição em cinco passos (RBV-5) a 20°C ou em um passo (R-1) a 38°C, sobre a motilidade, o vigor e a integridade de membrana de espermatozóides caprinos.....</b>	50
4.4.9	<b>Experimento 9 – Congelação em meio TRIS-gema contendo 300 mM de sacarose ou trealose, com ou sem a adição de glicerol, seguida de descongelação e rediluição progressiva em cinco passos (RBV-5) a 20°C ou de descongelação e rediluição abrupta em um passo (R-1) a 38°C.....</b>	52
4.5	<b>ANÁLISE DOS RESULTADOS.....</b>	52
5	<b>RESULTADOS .....</b>	53
5.1	<b>EXPERIMENTO 1 – MOTILIDADE E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS APÓS EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SOLUÇÕES HIPEROSMÓTICAS DE SACAROSE EM RINGER-LACTATO E APÓS RETORNO ABRUPTO À ISOSMOLALIDADE .....</b>	53
5.2	<b>EXPERIMENTO 2 – EFEITO DA OSMOLALIDADE E DO TEMPO DE INCUBAÇÃO EM SOLUÇÕES HIPEROSMÓTICAS DE SACAROSE EM RINGER-LACTATO SOBRE A INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS .....</b>	56
5.3	<b>EXPERIMENTO 3 – EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE AO MEIO DILUIDOR ANDROMED SOBRE A MOTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS APÓS DESCONGELAÇÃO E REDILUIÇÃO .....</b>	58

5.4	EXPERIMENTO 4 – EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO DILUIDOR TRIS-GEMA-GLICEROL ADICIONADO DE 375 MM DE SACAROSE E DA TEMPERATURA DE DESCONGELAÇÃO SOBRE A MOTILIDADE, VIGOR E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS .....	59
5.5	EXPERIMENTO 5 – EFEITO DA CONGELAÇÃO EM MEIO TRIS-GEMA CONTENDO SACAROSE (375 MM) E CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE GLICEROL SOBRE A MOTILIDADE, VIGOR E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS .....	63
5.6	EXPERIMENTO 6 – EFEITO DA VELOCIDADE DE REDILUIÇÃO PÓS-DESCONGELAÇÃO SOBRE A MOTILIDADE, VIGOR E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE SÊMEN CAPRINO CONGELADO EM DILUENTE TRIS-GEMA CONTENDO SACAROSE (375 MM) E CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE GLICEROL .....	67
5.7	EXPERIMENTO 7 – EFEITO DA CONGELAÇÃO EM MEIO TRIS-GEMA CONTENDO CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE SACAROSE E DE GLICEROL, E DA TEMPERATURA E VELOCIDADE DE REDILUIÇÃO PÓS-DESCONGELAÇÃO SOBRE A MOTILIDADE, VIGOR E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS .....	70
5.8	EXPERIMENTO 8 – EFEITO DA CONGELAÇÃO EM MEIO TRIS-GEMA CONTENDO 300 MM DE SACAROSE E 3,4% DE GLICEROL OU ETILENOGLICOL, SEGUIDA DE DESCONGELAÇÃO E REDILUIÇÃO EM CINCO PASSOS (RBV-5) A 20°C OU EM UM PASSO (R-1) A 38°C, SOBRE A MOTILIDADE, O VIGOR E A INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS .....	74
5.9	EXPERIMENTO 9 – CONGELAÇÃO EM MEIO TRIS-GEMA CONTENDO 300 MM DE SACAROSE OU TREALOSE, COM OU SEM A ADIÇÃO DE GLICEROL, SEGUIDA DE DESCONGELAÇÃO E REDILUIÇÃO PROGRESSIVA EM CINCO PASSOS (RBV-5) A 20°C OU DE DESCONGELAÇÃO E REDILUIÇÃO ABRUPTA EM UM PASSO (R-1) A 38°C .....	76
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>78</b>
6.1	EXPERIMENTO 1 .....	78
6.2	EXPERIMENTO 2 .....	85

6.3	EXPERIMENTO 3 .....	85
6.4	EXPERIMENTO 4 .....	87
6.5	EXPERIMENTO 5 .....	89
6.6	EXPERIMENTO 6 .....	91
6.7	EXPERIMENTO 7 .....	93
6.8	EXPERIMENTO 8 .....	95
6.9	EXPERIMENTO 9 .....	97
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>103</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>104</b>
	<b>APÊNDICES</b>	
	Apêndice 1 Diluentes à base de TRIS-gema.....	121
	Apêndice 2 Protocolo aplicado ao Experimento 1.....	122

## 1 INTRODUÇÃO

O caprino foi o primeiro ruminante a ser domesticado pelo homem, há cerca de dez mil anos. A fêmea desta espécie tem grande potencial para produzir leite de alto valor nutritivo e com melhor digestibilidade que o leite de vaca; sua prolificidade favorece seu uso como animal de corte, além de fornecer pele de ótima qualidade com variadas aplicações na indústria coureira. Somam-se a estas qualidades sua reconhecida docilidade e grande capacidade de adaptação, o que permite sua criação nas mais diversas condições ambientais e de manejo.

A caprinocultura é uma atividade em franca expansão em nosso país. A população de caprinos é estimada atualmente em 5,9 milhões de cabeças (ANUALPEC, 1999). O rebanho é constituído principalmente por animais sem raça definida e com baixos índices de produtividade. Entretanto, há alguns anos tem-se observado um processo de profissionalização dos caprinocultores de leite e, mais recentemente, também dos que lidam com raças de corte. A criação de caprinos visando à produção de carne tem se concentrado no Nordeste, mas o interesse por esta atividade cresce também no Sudeste. Um dos principais fatores que impulsionou este crescimento foi a introdução de raças especializadas para um alto rendimento de carcaça, destacando-se neste quesito a raça Boer, importada da África do Sul (SOUSA et al., 1998). O aumento da demanda interna pela carne caprina foi motivado, em parte, pelo resultado de pesquisas que a apontam como tendo menor conteúdo calórico que a do bovino e do ovino, com baixo teor de gordura, quase se igualando à carne de frango (BOTHÁ, 2000). Esta característica a qualifica para o mercado de produtos dietéticos. Além disso, em termos de mercado

externo, países do Oriente com forte tradição de consumo de carne desta espécie têm demonstrado interesse na sua importação. O fornecimento de carne caprina a estes mercados esbarra, todavia, na baixa taxa de desfrute e na baixa produtividade que ainda caracterizam nossos rebanhos de corte.

Uma das soluções para o problema da baixa produtividade tem sido a execução de cruzamentos de raças nativas com raças importadas especializadas para corte, como a raça Boer. A forte demanda por reprodutores e matrizes puros originou, entretanto, uma elevação no custo dos animais desta raça, o que restringiu sua utilização a um pequeno número de criadores.

Assim sendo, o desenvolvimento de técnicas que permitam ampliar o aproveitamento genético dos reprodutores a custo mais reduzido - como a inseminação artificial - são essenciais para aumentar o desempenho produtivo dos rebanhos e difundir a caprinocultura de corte no Brasil.

A criopreservação do sêmen altera as características das membranas dos espermatozoides, interferindo na sua capacidade fertilizante. Durante as fases de congelação e descongelação, ocorrem flutuações no volume celular, que contribuem para o dano celular quando os limites de tolerância das membranas são ultrapassados. A desidratação parcial das células previamente à congelação poderia minimizar estas flutuações de volume. Na natureza, alguns organismos resistem à dessecação e a baixas temperaturas, acumulando em suas células proteínas anti-congelação e dissacarídeos. Açúcares como a sacarose e a trealose teriam, além de sua ação osmótica, ação estabilizadora sobre os fosfolipídios e as proteínas da membrana. O glicerol é um dos crioprotetores mais usados, mas em determinadas concentrações, é tóxico para as células. Assim, definir um diluente para o sêmen caprino, que utilize solução hiperosmótica de sacarose ou trealose, permitiria

minimizar as alterações da membrana espermática decorrentes dos procedimentos de congelação e descongelação e melhorar a qualidade do sêmen criopreservado.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura foi dividida nos seguintes capítulos:

### 2.1 A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL NA ESPÉCIE CAPRINA

A inseminação artificial (IA) é instrumento de inegável importância para o melhoramento e a difusão da qualidade genética dos reprodutores, sendo empregada em muitas espécies de interesse zootécnico (DEWIT et al., 2000; EVANS; MAXWELL, 1987; HAFEZ; HAFEZ, 2000; MORROW, 1986; SEGOVIA et al., 2000). A difusão desta técnica só foi possível após o aperfeiçoamento das técnicas de congelação de sêmen, que permitiu sua conservação por tempo indeterminado e seu transporte para longas distâncias.

O caprino apresenta o maior rendimento de produção de células espermáticas por grama de parênquima testicular dentre as espécies até então estudadas (BECKER-SILVA, 2000), mesmo assim, o rendimento em doses de sêmen congeladas por ejaculado é muito inferior ao bovino. Isto se deve, em parte, ao número cerca de 10 vezes maior de espermatozóides recomendado por dose inseminante; sendo 100-200 milhões no caprino (HENRY; NEVES, 1998) e 10-15 milhões no bovino (HOLT, 2000a).

Na espécie caprina, a IA com sêmen congelado vem sendo praticada há muitos anos (CORTEEL, 1974; FRASER 1962; LYGSET et al. 1965). As técnicas

de criopreservação de sêmen caprino são, em sua maior parte, derivadas daquelas aplicadas ao sêmen bovino, consistindo na diluição do sêmen em preparados contendo um tampão, um energético e crioprotetores (EVANS; MAXWELL, 1987). O emprego da IA em caprinos tem esbarrado na dificuldade de se obter um protocolo ideal para a congelação do sêmen, havendo divergências entre os autores quanto aos métodos e ao melhor diluente a ser utilizado. Os trabalhos existentes na literatura científica permitem definir duas tendências: (a) a francesa, representada pelos experimentos de Roy (1957) e Corteel (1974; 1975a), que observaram efeitos deletérios do plasma seminal sobre os espermatozóides quando o sêmen era incubado em diluente contendo gema de ovo ou leite desnatado; o dano celular seria agravado após três meses de estocagem (CORTEEL, 1975a); (b) a teuto-australiana, cujos autores relataram resultados satisfatórios obtidos com sêmen caprino não-lavado e congelado em diluentes contendo gema de ovo (ANDRADE, 1996; AZERÊDO, 1999; DEKA; RAO, 1986; EVANS; MAXWELL, 1987; FERRARI, 1993; TULI; HOLTZ, 1994; TULI; HOLTZ, 1995); de acordo com esta tendência, a centrifugação dos espermatozóides deve ser evitada, pois tende a produzir danos irreversíveis à membrana das células, com perda de enzimas para o meio (TULI; HOLTZ, 1994).

Os autores da linha francesa recomendam que o ejaculado seja centrifugado com solução de lavagem antes da diluição e, em seguida, congelado em leite desnatado (MEMON; OTT, 1981; NUNES et al., 1982; SIMPLÍCIO; MACHADO, 1989) ou em diluente contendo água de coco com 5% de gema de ovo (NUNES et al., 1997). O fator presente no plasma seminal responsável pela ação desfavorável sobre os espermatozóides seria produzido na glândula bulbo-uretral (NUNES et al., 1982) e foi identificado como uma fosfolipase A<sub>2</sub> (PELLICER-RUBIO et al., 1997).

Esta enzima agiria sobre os fosfolipídios da gema do ovo e sobre os triglicerídeos da gordura do leite, originando respectivamente lisofosfolipídios (ROY, 1957) e ácido oléico (PELLICER-RUBIO; COMBARNOUS, 1998), que atuam desestabilizando a bicamada lipídica da membrana celular. Com base nestes dados, outros autores reafirmaram a necessidade da lavagem dos espermatozoides para retirada do plasma seminal (KESKINTEPE et al., 1998; MEMON et al., 1985; PELLICER-RUBIO; COMBARNOUS, 1998). Por outro lado, os autores da linha teuto-australiana consideram que a centrifugação demanda um tempo maior de exposição dos espermatozoides ao ambiente, resultando em maior dano celular, além de exigir mais equipamentos e trabalho, inviabilizando assim, seu uso a campo (PICKET et al., 1975).

A presença de gema de ovo no meio protege as células contra choque térmico a 0°C (DEVIREDDY et al., 1999) e, em diluentes a base de TRIS, tem se mostrado benéfica para a motilidade e integridade de acrossoma pós-descongelamento de espermatozoides não-lavados de caprinos Angorá (DAPKIN; TEKÝN, 1996) e para a sobrevivência a 37°C tanto de sêmen lavado quanto não-lavado de caprinos Angorá (RITAR; SALAMON, 1991). De acordo com estes últimos autores, entretanto, a concentração de gema no diluente não deveria ultrapassar 1,5%, pois existiriam diferenças raciais e individuais na tolerância dos espermatozoides ao nível de gema.

Em diversos estudos, a motilidade pós-descongelamento de sêmen caprino não foi afetada pela presença de plasma seminal (AZERÊDO, 1999; PUROHIT et al., 1992; RITAR; SALAMON, 1982; TREJO et al., 1987; TREJO et al., 1992). A lavagem do sêmen não trouxe benefício para a preservação da viabilidade de sêmen caprino, resfriado em diluente contendo fosfolipídios de leite (LEBOEUF et al., 2003) ou gema de ovo (ROCA et al., 1997). A fertilidade após IA não diferiu (CORTEEL, 1975b;

DEKA; RAO, 1989; RITAR; SALAMON, 1983; ROCA et al., 1997) ou foi inferior (ANDRADE, 1996) nos grupos submetidos à lavagem do sêmen.

O efeito deletério da gema de ovo sobre o sêmen caprino ocorreria em apenas duas horas de incubação a 37°C; seria mais intensa em amostras de sêmen não-lavado e na presença de concentrações mais altas de gema (RITAR; SALAMON, 1982; ROY, 1957) e continuaria a ocorrer mesmo durante a estocagem no nitrogênio líquido (RITAR; SALAMON, 1991). Outros autores, entretanto, não detectaram qualquer decréscimo na motilidade de sêmen caprino não-lavado, congelado em diluente contendo gema e estocado por um período de 12 meses (PINTADO; PEREZ, 1992) ou de até quatro anos (FERRARI et al., 1998).

A ausência de padronização nos critérios de avaliação do sêmen pós-descongelamento, bem como nas técnicas de IA utilizadas, dificulta a comparação dos resultados obtidos por diferentes autores quanto à fertilidade *in vivo* e a inconsistência dos resultados tem prejudicado a difusão da IA em caprinos. No Brasil, dados de Simplício e Machado (1989) apontam o uso desta técnica em menos de 1% das matrizes caprinas. Além disto, o pequeno volume de sêmen obtido em cada ejaculado e o alto índice de partidas de sêmen congelado reprovadas elevam significativamente os custos do processo, inviabilizando-o economicamente (CHANDLER et al., 1988) e dificultando seu emprego entre os pequenos criadores.

## 2.2 EFEITOS DO RESFRIAMENTO E DA CONGELAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE DOS ESPERMATOZÓIDES

Foi demonstrado em diversas espécies que o resfriamento e, principalmente, a congelação dos espermatozóides, alteram as características das membranas celulares (BUHR et al., 1994; CHESHMEDJIEVA; VAISBERG, 1994; De BAULNY et al., 1999; De LEEUW et al., 1991; HINKOVSKA-GALCHEVA et al., 1989; LESSARD et al., 1999; SEGOVIA et al., 2000), diminuindo sua capacidade fecundante (BLESBOIS et al., 1997; HOLT, 2000b). A maior ou menor sensibilidade dos espermatozóides ao resfriamento e à congelação parece ser inerente a cada espécie (De LEEUW et al., 1991; DROBNIS et al., 1993; HINKOVSKA-GALCHEVA et al., 1989; HOLT, 2000b), sendo determinada pela composição em fosfolipídios e colesterol da membrana plasmática (BLESBOIS et al., 1997; DROBNIS et al., 1993; HINKOVSKA-GALCHEVA; SRIVASTAVA, 1993; McMULLEN et al., 1999; WHITE, 1993). A composição da membrana, por sua vez, seria influenciada pela fase de maturação da célula (COOPER; YEUNG, 2003; RANA et al., 1991; RANA et al., 1993), pela alimentação (BLESBOIS et al., 1997) e pela idade do animal (CEROLINI et al., 1997). Durante o abaixamento da temperatura, os fosfolipídios da membrana passariam da fase líquido-cristalina para a fase de gel, sendo que o dano celular oriundo do resfriamento parece advir de um rearranjo dos fosfolipídios durante a transição entre essas fases (HOLT; NORTH, 1985; LADHA et al., 1997). Durante

esta transição, ocorreriam falhas na bicamada lipídica, permitindo a passagem desordenada de substâncias entre o citoplasma e o meio extracelular (DROBNIS et al., 1993). Além disso, os diferentes fosfolipídios da membrana apresentariam temperaturas de transição de fase ( $T_m$ ) diferentes; à medida que a temperatura vai sendo reduzida, os lipídios de  $T_m$  mais baixa, ainda na fase líquido-cristalina, se concentrariam em domínios à parte (CROWE et al., 1999; McMULLEN et al., 1999), favorecendo o aparecimento de estruturas do tipo hexagonal invertida e outras similares, etapas intermediárias nos processos de fusão de membranas (WOLFE; BRYANT, 1999). Trabalhos de outros autores confirmam este processo, mostrando que a criopreservação induz ou antecipa a fusão de membranas, típica da reação acrossômica (COLLIN; BAILEY, 1999; CORMIER et al., 1997; THUNDATHIL et al., 1999).

Os lipídios da membrana do espermatozóide caprino teriam temperatura de transição de fase em torno de  $21^{\circ}\text{C}$ , para o espermatozóide humano seria de  $13,6^{\circ}\text{C}$  e para o espermatozóide de camarão de  $0,86^{\circ}\text{C}$ . Isto teria correlação com a sensibilidade destas células aos danos por resfriamento e congelação (CROWE et al., 1989).

Outro mecanismo que causaria dano celular durante o processo de congelação e descongelação seriam as flutuações de volume experimentadas pelas células. Os espermatozóides têm pouco citoplasma, mas comportam-se como osmômetros, exibindo respostas lineares às alterações osmóticas do meio externo em diversas temperaturas acima de  $0^{\circ}\text{C}$  (LIU; FOOTE, 1998) desde que os limites da membrana não sejam ultrapassados. Na fase de congelação, à medida que a temperatura diminui e a água no meio extracelular congela, as células são expostas a soluções crescentemente hiperosmóticas e desidratam. Durante a descongelação,

o meio intracelular está hiperosmótico em relação ao extracelular, o que provoca um rápido fluxo de água para dentro da célula, aumentando temporariamente seu volume, até que se estabeleça o equilíbrio osmótico entre os compartimentos intra e extracelular e a célula retorne a seu volume normal (GAO et al., 1993; HOLT, 2000b; LEVIN; MILLER, 1981). O retorno à condição isosmótica, que ocorre durante a descongelação, é uma importante causa de dano celular, o que sugere que melhores técnicas de descongelação poderiam melhorar a sobrevivência espermática pós-criopreservação (HOLT; NORTH, 1994). Alguns estudos têm mostrado que os mecanismos que regem a resistência dos espermatozóides às variações de volume podem estar diretamente relacionados à sobrevivência espermática após criopreservação. Espécies cujos espermatozóides são reconhecidamente mais resistentes à congelação, como o humano e o bovino, mostram tolerância a uma faixa de osmolalidade mais ampla quando expostos a soluções anisosmóticas. O limite de tolerância em soluções hiperosmóticas seria de 2.500 mOsm para o espermatozóide humano (GAO et al., 1993, 1995) e 1.200 mOsm para o bovino (LIU; FOOTE, 1998). Em contrapartida, espermatozóides considerados mais sensíveis, como o suíno e o eqüino, mostram pouca tolerância às variações de osmolalidade. No caso do suíno, a exposição por 10 min a uma solução de citrato de sódio 450 mOsm causou um decréscimo de 30% na integridade de membrana em relação à amostra em meio isotônico (FRASER et al., 2001), enquanto o espermatozóide eqüino mostrou queda de 20% na IM após 5 min em solução de NaCl a 587 mOsm (CAIZA de la CUEVA et al., 1997a). O espermatozóide ovino mostrou resistência intermediária, não tendo havido danos à membrana em solução de citrato de sódio a 910 mOsm (PERIS et al., 2000). No espermatozóide murino, a tolerância observada foi de, no mínimo 2.400 mOsm,

antes de ocorrer significativa perda de viabilidade (WILLOUGHBY *et al.*, 1996), o que não confirma a conhecida sensibilidade desta espécie à criopreservação. A tolerância às excursões de volume seria condicionada por fatores inerentes a cada tipo celular, tais como o percentual de água osmoticamente ativa e a permeabilidade da membrana à água e a cada crioprotetor permeante em particular. A permeabilidade seria por sua vez, influenciada pelos solutos não-permeantes dissolvidos no meio, pelo próprio crioprotetor permeante e pela temperatura (AGCA *et al.*, 2002; DEVIREDDY *et al.*, 1999; GILMORE *et al.*, 1995; GILMORE *et al.*, 2000).

Curry e Watson (1994) relataram que a viabilidade dos espermatozóides ovino e humano foi menos afetada pela desidratação em soluções hipertônicas que pela dilatação celular após diluição em meio hipotônico. Gao *et al.* (1993) encontraram que o estresse hipertônico imposto por soluções concentradas de substâncias iônicas como o NaCl foi mais danoso aos espermatozóides humanos que o causado por substâncias não-iônicas como a sacarose. Estes estudos indicaram que soluções hipertônicas poderiam ser usadas para causar desidratação espermática sem causar dano, desde que respeitado o limite de tolerância osmótica dos espermatozóides da espécie em questão, o que permitiria congelação rápida sem o risco de induzir formação de gelo intracelular.

Em Liu *et al.* (1998) e Woelders *et al.* (1997), a desidratação parcial de espermatozóides bovinos em meio hipertônico contendo sacarose permitiu uma maior velocidade de congelação. Koshimoto e Mazur (2002a), ao congelarem espermatozóides murinos em meio hipertônico com 18% de rafinose, também utilizaram velocidade de congelação maior que a utilizada quando o glicerol era o crioprotetor. Liu e Foote (1998) observaram que a sacarose pode prover proteção adicional aos espermatozóides durante as oscilações de volume que ocorrem na



congelamento e descongelamento. Estes autores recomendam a desidratação prévia dos espermatozoides para melhorar a sobrevivência na criopreservação.

A partir do conhecimento de características fundamentais e espécie-específicas dos processos bioquímicos e biofísicos inerentes à congelamento e à descongelamento, seria possível construir, a partir de fórmulas matemáticas, modelos simulados capazes de prever, com grau crescente de acerto, os resultados obtidos em experimentos empíricos (DEVIREDDY *et al.*, 1999; GAO *et al.*, 1995; GILMORE *et al.*, 1997). Para isto, entretanto, certas características de permeabilidade da membrana espermática e os limites de tolerância osmótica precisariam ter seus valores definidos para cada espécie animal.

Ao considerar o fato de que os procedimentos de congelamento de sêmen desenvolvidos e aplicados com sucesso para uma espécie não produzem necessariamente os mesmos resultados quando aplicados a outra espécie, deve-se ter cautela ao fazer extrapolações de uma espécie para outra (LIU *et al.*, 1998).

### 2.3 CRIOPROTETORES PERMEANTES E NÃO-PERMEANTES

Com o intuito de reduzir os danos causados às células durante o processo de criopreservação, diversas substâncias foram estudadas e mostraram-se úteis como agentes crioprotetores. Os crioprotetores mais utilizados nos diluentes de sêmen são macromoléculas, como a caseína do leite, as proteínas da gema de ovo e o glicerol (EVANS; MAXWELL, 1987). O glicerol teria como principal ação baixar a temperatura de congelamento do meio intracelular (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990),

prevenindo a formação de cristais de gelo. Na congelação de sêmen caprino extraído do epidídimo, Kundu et al. (2002) obtiveram 60% de recuperação da motilidade ao combinar o efeito crioprotetor extracelular do polímero dextran com o efeito crioprotetor intracelular do glicerol.

Os solventes orgânicos de ação crioprotetora como o glicerol e o DMSO teriam a habilidade de se incluir entre os lipídios da membrana, tornando-a mais flexível (SHIER, 1988).

O glicerol teria ainda, a propriedade de interagir com as cabeças polares dos fosfolipídios da membrana (KUNDU *et al.*, 2000; PARKS; GRAHAM, 1992), baixando a  $T_m$  e diminuindo a adesividade entre as células (PALASZ *et al.*, 2000). Este efeito crioprotetor do glicerol parece se estabelecer em menos de cinco minutos após sua adição (ALMLID; JOHNSON, 1988; MATOS *et al.*, 1992), o que indica a possibilidade de uma ação crioprotetora extracelular. Apesar de sua reconhecida qualidade como crioprotetor, foi observado que concentrações mais elevadas de glicerol seriam tóxicas para os espermatozóides (KUNDU *et al.*, 2000), talvez por acelerarem a reação acrossômica (SLAVIK, 1987) ou por induzirem a fusão indiscriminada de membranas (AGCA et al., 2002). A susceptibilidade a este efeito varia conforme a espécie animal (De BAULNY *et al.*, 1999; DEVIREDDY et al., 1999; LIU *et al.*, 1998; WHITE, 1993).

Para melhorar os resultados obtidos na congelação do sêmen e para tentar reduzir a concentração de glicerol utilizada (AN *et al.*, 2000; MORANI, 2000; PALASZ *et al.*, 2000), alguns pesquisadores estudaram seres vivos que vivem em regiões frias, cujas células são naturalmente resistentes a temperaturas próximas de 0°C. Entre tais seres vivos incluem-se peixes (HAYS *et al.*, 1996), artrópodes (HONTORIA *et al.*, 1998), fungos (SANO *et al.*, 1999) e bactérias (BILLI *et al.*, 2000).

No soro sangüíneo de peixes que vivem em regiões polares, foram encontradas proteínas anti-congelantes, que teriam a propriedade de se ligar aos núcleos formadores de gelo, impedindo sua proliferação e baixando o ponto de congelação do sangue (HAYS *et al.*, 1996). Em artrópodes, fungos e bactérias, submetidos ao estresse por resfriamento ou por dessecação, foi observado que suas células acumulam dissacarídeos, especialmente a trealose. Esta proteção, que os açúcares exercem sobre as membranas celulares durante a congelação e a desidratação, seria o resultado do abaixamento da  $T_m$  dos lipídios da membrana e da vitrificação do meio em baixas concentrações de água (CROWE *et al.*, 1998). A trealose em especial, apresentaria a capacidade de estabelecer pontes de hidrogênio com as cabeças polares dos fosfolipídios da membrana, causando uma redução, por exemplo, de 10°C na  $T_m$  da dipalmitoil fosfatidilcolina (TSVETKOVA *et al.*, 1998). Além disso, entre os monossacarídeos e os oligossacarídeos, a trealose estaria localizada no extremo superior de temperatura de vitrificação ( $T_g$ ), com um valor médio de 110°C (os valores para a sacarose e glicose seriam de 65 e 30°C, respectivamente). Esta alta  $T_g$  garantiria que os materiais vitrificados com trealose tivessem maior estabilidade frente a temperaturas mais elevadas (CROWE *et al.*, 1998, 2001). Experimentos mostraram efeito positivo da adição de 0,25 M de trealose ao meio de congelação para embriões suínos (MARTINEZ *et al.*, 1999) e de uma concentração de 67% de trealose no meio de vitrificação de embriões e oócitos murinos (KULESHOVA *et al.*, 1999). A adição deste açúcar mostrou-se também promissora para congelação de sêmen, em concentrações de 0,35 mol/kg (AN *et al.*, 2000) ou 300 mM (SZTEIN *et al.*, 2001) no diluente para sêmen de camundongo e de 100 mM para sêmen de ovinos (AISEN *et al.*, 1999, 2000).

Além de sua ação estabilizadora sobre os fosfolipídios da membrana celular, os dissacarídeos teriam a capacidade de preservar as proteínas da membrana. Açúcares como a sacarose e a trealose, substituiriam a água de hidratação presente entre as cadeias de aminoácidos, mantendo a proteína estável em seu arranjo tridimensional e evitando sua desnaturação (LESLIE *et al.*, 1995). Esta ação seria útil para a criopreservação do sêmen, pois a perda da atividade enzimática de proteínas da membrana, como a fosfolipase A<sub>2</sub>, afetaria a capacidade fertilizante dos espermatozoides (DICK; BUHR, 1994). Seguindo esta linha de pensamento, pesquisas mostraram o efeito crioprotetor de dissacarídeos e trissacarídeos na criopreservação de sêmen de camundongo, mesmo quando estes solutos foram empregados isoladamente em solução aquosa (AN *et al.*, 2000), ou associados ao leite desnatado (SZTEIN *et al.*, 2001). Além disso, a introdução do dissacarídeo trealose no citoplasma celular potencializou seu efeito crioprotetor (CHEN *et al.*, 2001; EROGLU *et al.*, 2000; GUO *et al.*, 2000).

Solutos como os açúcares poderiam ainda aumentar a pressão osmótica do diluente, induzindo à desidratação parcial das células previamente à congelação e minimizando as flutuações de volume e o dano celular (AN *et al.*, 2000; CURRY; WATSON, 1994; KOSHIMOTO; MAZUR, 2002a; LIU *et al.*, 1998; LIU; FOOTE, 1998; WOELDERS *et al.*, 1997).

### 3 OBJETIVO GERAL

- Definir os limites de tolerância do espermatozóide caprino em soluções anisomóticas, assim como um diluente que minimize as excursões de volume celulares, reduzindo o dano celular imputado pela criopreservação.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a motilidade (MOT) e a integridade da membrana espermática (IM) após diluição de sêmen caprino não-lavado, em soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato (RL), assim como após rediluição em soluções sem sacarose e retorno à isosmolalidade.
- Comparar os resultados de MOT e IM, em sêmen de caprino diluído e congelado em meio à base de TRIS-gema de ovo (TG) e em meio comercial AndroMed (And) à base de lecitina de soja, adicionados de diferentes concentrações dos crioprotetores não-permeantes sacarose e trealose e dos crioprotetores permeantes glicerol e etilenoglicol, variando-se a duração e a temperatura de cada fase do processo de criopreservação.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O capítulo de Material e Métodos foi dividido nos subcapítulos

### 4.1 ANIMAIS E MANEJO

Os experimentos foram conduzidos no Instituto para Produção Animal e Genética dos Animais Domésticos (Institut für Tierzucht und Haustiergenetik) da Georg-August Universidade de Göttingen, Alemanha. Foram utilizados cinco bodes (*Capra hircus*) da raça Boer, maduros sexualmente, com idades entre 1,5 e 3,5 anos, mantidos em regime de criação intensivo, recebendo água, feno e sal balanceado *ad libitum* e 1,5 kg de concentrado por cabeça por dia.

### 4.2 COLHEITA E ANÁLISE DO SÊMEN

O regime de colheitas de sêmen variou de uma a três vezes por semana, não regular. Os experimentos foram conduzidos em módulos, que variaram de um a dois meses de duração cada um e se estenderam de março de 2003 a março de 2004. A colheita do sêmen de cada animal foi feita com vagina artificial aquecida a 42°C, deixando o macho em liberdade e exposto a uma cabra devidamente contida, que apresentava ou não sinais de estro. Cada ejaculado foi considerado uma unidade

amostral, sendo então analisado quanto à motilidade total e vigor, repartido em alíquotas e diluído em uma das soluções a serem testadas.

Os ejaculados obtidos foram avaliados de acordo com os critérios macroscópicos utilizados por Henry e Neves (1998); a motilidade e o vigor foram avaliados subjetivamente em microscópio óptico, com aumento de 100x. Os resultados de motilidade (MOT) e vigor (VIG) foram expressos em percentual normalizado para a amostra nativa. Verificou-se a integridade de membrana (IM) pelo método da coloração com eosina-nigrosina, adicionando-se uma gota do corante a igual volume da amostra de sêmen a ser avaliada. Sobre lâmina de microscopia pré-aquecida, a gota de sêmen e a de corante foram misturadas rapidamente, confeccionando-se um esfregaço fino e contando-se posteriormente no mínimo 300 espermatozóides em microscópio óptico, em aumento de 400x. Os espermatozóides que apresentaram cabeça total ou parcialmente corada foram considerados como de membrana lesada. Os resultados foram expressos em percentual de células com membrana íntegra normalizado para o resultado do grupo controle (valor obtido no grupo tratado/valor obtido no grupo controle x 100).

#### 4.3 SOLUÇÕES E REAGENTES

O diluente comercial AndroMed foi gentilmente cedido por Minitüb Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co. KG (Tiefenbach-Germany). A solução comercial de Ringer-lactato (B. Braun Melsungen AG – Melsungen – Germany), a frutose e a sacarose (Serva Electrophoresis GmbH – Heidelberg-Germany), TRIS-hidroxi-

aminometano (Paesel-Lorei GmbH & Co. KG – Hanau – Germany), ácido cítrico e glicerol (Merck KgaA – Darmstadt – Germany) e a trealose (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH – Steinheim-Germany) utilizados para confecção dos outros diluentes, eram de grau analítico e foram adquiridos de representantes locais dos citados fabricantes.

#### 4.4 DILUIÇÃO E PROCESSAMENTO DO SÊMEN – DESCRIÇÃO DOS EXPERIMENTOS

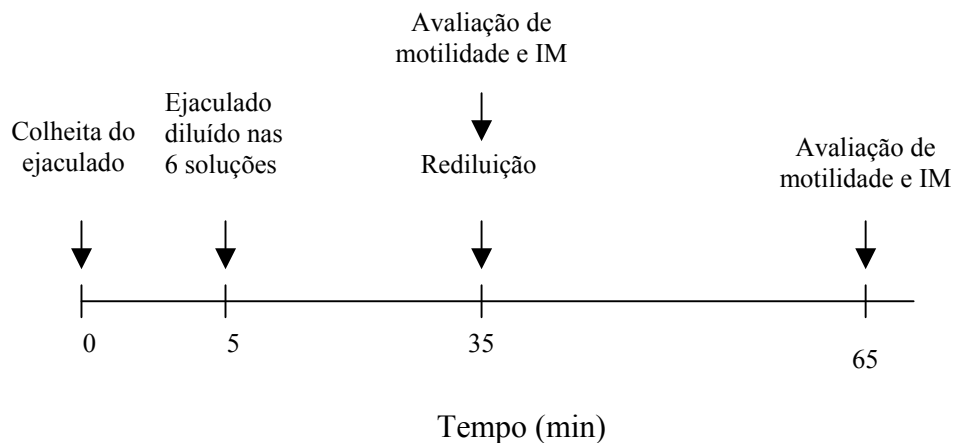
Os diferentes experimentos estão descritos a seguir

##### **4.4.1 Experimento 1 – Motilidade e integridade de membrana de espermatozóides caprinos após exposição a diferentes soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato e após retorno abrupto à isosmolalidade**

Com o intuito de avaliar o limite de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e o efeito da rediluição e retorno abrupto à condição isosmótica sobre os parâmetros de MOT e IM, foram colhidos 11 ejaculados de três bodes, retirando-se seis alíquotas de 0,1 ml de cada ejaculado. Cada alíquota foi diluída a 38°C em etapa única, em um volume de 2,5 ml de cada



uma das seguintes soluções: solução comercial de Ringer-lactato (RL), considerada como controle isosmótico, e cinco soluções hiperosmóticas de sacarose diluída em RL. Após a adição do sêmen, a osmolalidade final alcançada em cada uma das seis soluções foi de 260, 490, 590, 690, 930 e 2050 mOsm. Após 30 min de incubação a 38°C, 20 µl de cada amostra foram rediluídos abruptamente em 200 µl de RL à mesma temperatura, no intuito de retornar os espermatozóides a uma condição próxima da isosmolalidade (260, 280, 290, 310, 320, 370 mOsm após a rediluição dos seis tratamentos, respectivamente). A avaliação da MOT e a confecção do esfregaço corado com eosina-nigrosina foram feitos retirando-se uma parcela de cada solução no momento anterior à sua rediluição e 30 min após a rediluição em RL. Abaixo segue a ilustração do protocolo (ver também Apêndice 2).



#### **4.4.2 Experimento 2 – Efeito da osmolalidade e do tempo de incubação em soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato sobre a integridade de membrana de espermatozóides caprinos**

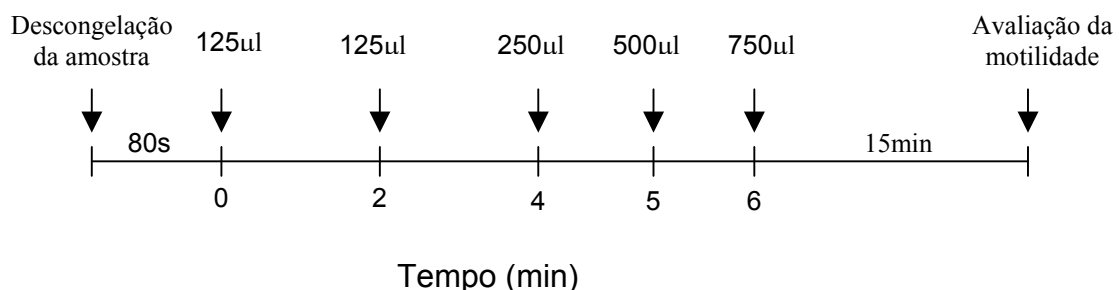
Este experimento avaliou o efeito do tempo de incubação sobre a IM de espermatozóides caprinos mantidos em solução hiperosmótica de sacarose a 38°C e, além disso, preencheu a lacuna de osmolalidade que havia no Experimento 1, entre 930 e 2050 mOsm, ao introduzir um grupo experimental de solução de sacarose de 1.500 mOsm. Foram colhidos 11 ejaculados de quatro bodes, retirando-se quatro alíquotas de 0,1 ml de cada ejaculado. Cada alíquota foi diluída a 38°C em um volume de 2,5 ml de cada uma das seguintes soluções: a) solução RL; b) três soluções hiperosmóticas de sacarose diluída em RL. Após a adição do sêmen, a osmolalidade final alcançada em cada uma das quatro soluções foi de 260, 900, 1500 e 2250 mOsm. As amostras foram incubadas em banho-maria a 38°C por 1, 2, 5 e 10 min e não foram rediluídas. Confeccionaram-se lâminas para avaliação de IM de cada uma das soluções, em cada um dos citados tempos.

#### **4.4.3 Experimento 3 – Efeito da adição de diferentes concentrações de sacarose ao meio diluidor AndroMed sobre a motilidade de espermatozóides caprinos após descongelação e rediluição**

Baseando-se nos resultados obtidos nos Experimentos 1 e 2, em que a IM do espermatozóide caprino não foi afetada por soluções hiperosmóticas de sacarose até 930 mOsm e que a incubação por até 10 min a 38°C na citada faixa de osmolalidade era bem tolerada pela membrana celular, buscou-se neste experimento avaliar os efeitos sobre a MOT pós-descongelação, de diferentes concentrações de sacarose em um diluente comercial para congelação de sêmen bovino, contendo glicerol e lipídios de soja. Foram colhidos cinco ejaculados de quatro bodes, diluindo-se em seguida cada ejaculado em And a 38°C na proporção 1 ml:1 ml e, após 3 min, adicionando-se mais 13 ml do diluente. O sêmen, acondicionado em um tubo de vidro, foi colocado em um copo plástico com água à mesma temperatura e levado à câmara fria a 4°C. Após 2 horas de resfriamento, a amostra foi dividida em três alíquotas. Duas alíquotas receberam soluções concentradas de sacarose em And, alcançando ao final da diluição, a concentração de 375 e 500 mM de sacarose, respectivamente. A terceira alíquota recebeu And sem sacarose e serviu como controle. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 ml, equilibradas por 10 min (contados a partir do momento da adição do diluidor contendo sacarose) e congeladas em vapor de nitrogênio. Para a congelação, as palhetas foram colocadas sobre uma tela montada em uma moldura de *isopor* que flutuava sobre o nitrogênio líquido, mantendo as amostras a cerca de 2 cm de distância da superfície do líquido. As palhetas foram mergulhadas no nitrogênio

decorridos 8-9 min. Após um período mínimo de 24 horas de estocagem em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ , as amostras contendo sacarose foram descongeladas agitando-se a palheta por 30 s em água a  $4^{\circ}\text{C}$ . Esta temperatura de descongelação foi utilizada baseando-se em resultados de testes prévios, que a indicaram como favorável às amostras de sêmen congeladas com alta concentração de sacarose. A influência benéfica da baixa temperatura está descrita no Experimento 4. Após a descongelação, o conteúdo da palheta foi depositado em um tubo de vidro pré-resfriado e em seguida, procedeu-se à rediluição para retorno à condição isosmótica. Esta rediluição foi feita progressivamente, adicionando-se And nos volumes e intervalos de tempo ilustrados no esquema a seguir:

### Etapas da Rediluição



Os volumes adicionados nos cinco passos da rediluição foram escolhidos arbitrariamente pela facilidade de serem memorizados e por representarem aproximadamente, a cada passo, adição de cerca de 50% do volume anterior. Este método de rediluição foi posteriormente, no Experimento 6, denominado de Rediluição Baseada em Volume (RBV-5). O diluente AndroMed foi aqui utilizado

para rediluir as amostras pois, em testes anteriores (resultados não mostrados aqui), foi mais favorável à MOT que a rediluição em RL.

Todo o processo de rediluição foi conduzido em câmara fria a 4°C. Depois de concluída a rediluição, as amostras foram levadas ao banho-maria a 38°C e incubadas por 15 min antes de serem avaliadas para MOT. O grupo controle foi descongelado pelo protocolo padrão, em água a 38°C por 30 s, sendo também avaliado para MOT após 15 min.

#### **4.4.4 Experimento 4 – Efeito do tempo de exposição ao diluidor TRIS-gema-glicerol adicionado de 375 mM de sacarose e da temperatura de descongelação sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozóides caprinos**

Tendo por base os resultados do Experimento 3, em que a MOT do grupo que recebeu a adição de 375 mM de sacarose 10 min antes da congelação não diferiu do grupo Controle, buscou-se aqui avaliar se a redução no tempo de exposição dos espermatozóides às altas concentrações de sacarose, antes da congelação, traria melhores resultados nos parâmetros espermáticos pós-descongelação. A partir deste experimento, o diluente TRIS-gema-glicerol (TGG) passou a ser o diluente padrão, pois não foi possível obter junto à empresa fabricante do diluidor de sêmen AndroMed uma formulação especial sem glicerol, que permitisse controlar a adição deste componente.

A fórmula do diluente TGG está descrita no Apêndice 1.

Foram colhidos 16 ejaculados de três bodes, sendo diluídos em quatro etapas em meio TGG, segundo protocolo descrito em Tuli e Holtz (1992), e resfriados como descrito no Experimento 3. Ao final do período de resfriamento, a amostra foi dividida em duas alíquotas; a primeira recebeu solução concentrada de sacarose em TGG a 4°C, em proporção adequada a resultar em uma concentração final de 375 mM, foi envasada e as palhetas foram congeladas em 2, 5 e 10 min após a adição da sacarose. A segunda alíquota, sem sacarose, serviu como controle, sendo congelada seguindo o protocolo padrão para TGG (TULI; HOLTZ, 1992) e descongelada em água a 38°C por 30 s. A congelação, descongelação e rediluição das amostras contendo sacarose foram realizadas como descrito no Experimento 3, alcançando-se uma osmolalidade pós-rediluição de ~420 mOsm. Quinze minutos após a descongelação e rediluição dos grupos tratados e do grupo Controle, foram avaliados os parâmetros de MOT, VIG e IM.

#### **4.4.5 Experimento 5 – Efeito da congelação em meio TRIS-gema contendo sacarose (375 mM) e concentrações reduzidas de glicerol sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozóides caprinos**

Tendo-se observado no Experimento 4 que a exposição pré-congelação dos espermatozóides à solução de sacarose a 4°C por 5 min antes da congelação não diferia em MOT e VIG do tempo de 2 min, e mostrava-se tecnicamente mais executável do que este, passou-se a utilizar este intervalo, a partir do presente

experimento, como tempo de equilíbrio padrão. Neste experimento buscou-se testar a hipótese de que, na presença de sacarose, a redução do conteúdo de Gly do diluente seria benéfica para os espermatozóides.

Diluentes à base de TRIS-gema (TG) adicionados de sacarose (375 mM) e contendo três diferentes concentrações finais de glicerol (1,7, 3,4 e 6,8% v/v), foram comparados com o diluente controle sem sacarose (TGG com 6,8% de glicerol). Foram colhidos 10 ejaculados de três bodes, retirando-se quatro alíquotas de cada ejaculado. Três alíquotas foram diluídas a 38°C em duas etapas no TG (1:1 e 1:1,5 em intervalo de 3 min). A quarta alíquota foi diluída em TGG e processada como descrito no Experimento 4. Após o período de resfriamento a 4°C por 2 horas, cada uma das três alíquotas em TG recebeu a adição de uma das três soluções de Sacarose-Gly-TG, sendo em seguida, equilibrada por 5 min antes de ser congelada no vapor de nitrogênio. Após a adição desta segunda fração do diluente ao sêmen, a osmolalidade final alcançada nas soluções contendo sacarose foi de ~1000 mOsm (descontando-se o glicerol). A descongelação e a rediluição foram conduzidas como descrito no Experimento 3 e foram avaliados os parâmetros de MOT, VIG e IM. Adicionalmente, foi feita avaliação de MOT e VIG após 2 e 6 horas de incubação a 38°C.

#### **4.4.6 Experimento 6 – Efeito da velocidade de rediluição pós-descongelação sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana de sêmen caprino congelado em diluente TRIS-gema contendo sacarose (375 mM) e concentrações reduzidas de glicerol**

Para avaliar o efeito da velocidade de rediluição após descongelação nos parâmetros de MOT e IM, amostras de sêmen contendo sacarose e concentrações reduzidas de glicerol, congeladas como no Experimento 5, foram descongeladas a 4°C e rediluídas em TG seguindo um dos três protocolos: (a) rediluição baseada em volume (RBV-5) em cinco passos a 4°C (como descrito no Experimento 3), que resultava em decréscimos de cerca de 245, 110, 100, 80 e 45 mOsm entre cada etapa, obtendo-se osmolalidade final de 420 mOsm; (b) rediluição a 4°C em cinco passos em intervalos de 1 min, onde o decréscimo de osmolalidade entre as etapas era fixo em 120 mOsm (R-5) e o volume variável (58, 92, 172, 430 e 3000  $\mu$ l); (c) rediluição a 4°C em três passos fixos de 200 mOsm (R-3) em intervalos de 1 min e volume variável (114, 303 e 3335  $\mu$ l); estes dois últimos protocolos resultavam em uma osmolalidade final de cerca de 400 mOsm. Após a rediluição, as amostras foram levadas ao banho-maria e avaliadas para MOT, VIG e IM após 15 min e para MOT e VIG, após 2 e 6 horas de incubação a 38°C.



#### **4.4.7 Experimento 7 – Efeito da congelação em meio TRIS-gema contendo concentrações reduzidas de sacarose e de glicerol, e da temperatura e velocidade de rediluição pós-descongelação sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozóides caprinos**

Basendo-se nos resultados do Experimento 5, em que a redução do conteúdo de Gly para 1,7% mostrou-se favorável quando comparada ao grupo controle, buscou-se avaliar se uma concentração mais baixa de sacarose, combinada a concentrações restritas de glicerol, seria eficaz. Além disso, baseando-se nos resultados do Experimento 6, em que a rediluição RBV-5 a 4°C foi em geral superior às rediluições mais rápidas, buscou-se verificar a interação do diluente com a temperatura e a velocidade de rediluição, tendo como hipótese que, à uma temperatura mais alta (20°C), a permeabilidade da membrana aumentaria e seria possível uma rediluição mais rápida.

Neste experimento, diluentes à base de TG adicionados de sacarose (375 mM ou 300 mM) e contendo duas concentrações finais reduzidas de glicerol (1,7 e 3,4% v/v), compuseram os seguintes grupos: a) 375 mM Sac/1,7% Gly; b) 300 mM Sac/3,4% Gly e c) 300 mM Sac/1,7% Gly. Foram colhidos 15 ejaculados de quatro bodes, retirando-se quatro alíquotas de cada ejaculado. A pré-diluição e o resfriamento em TG seguiram como descrito no Experimento 5. A quarta alíquota foi diluída em TGG com 6,8% de glicerol e sem sacarose e serviu como controle, sendo processada como descrito no Experimento 4. Após o resfriamento a 4°C por 2 h, cada grupo recebeu a adição de uma das três soluções de Sac-Gly-TG, sendo em seguida, equilibrado por 5 min antes da congelação em vapor de nitrogênio. Após a

adição do sêmen, a osmolalidade final alcançada nas soluções contendo sacarose foi de ~1000 mOsm (375 mM de Sac) e de ~820 mOsm (300 mM de Sac), descontando-se a fração glicerol. Cada grupo foi descongelado seguindo três metodologias: a) Descongelação a 4°C seguida de rediluição RBV-5 a 4°C, b) descongelação a 20°C seguida de rediluição RBV-5 a 20°C e c) descongelação a 20°C seguida de rediluição em dois passos (R-2) a 20°C (adição de 168 µl de TG no 1° passo e 1670 µl no 2° passo), que resultavam em decréscimo de 300 mOsm/passo de rediluição no grupo contendo 375 mM de sacarose e de 200 mOsm/passo de rediluição nos grupos contendo 300 mM de sacarose. A avaliação pós-descongelação dos tratamentos com e sem sacarose foi conduzida após 15 min e 2 e 6 horas de incubação a 38°C, como descrito no Experimento 5.

#### **4.4.8 Experimento 8 – Efeito da congelação em meio TRIS-gema contendo 300 mM de sacarose e 3,4% de glicerol ou etilenoglicol, seguida de descongelação e rediluição em cinco passos (RBV-5) a 20°C ou em um passo a 38°C, sobre a motilidade, o vigor e a integridade de membrana de espermatozóides caprinos**

No experimento anterior, o diluente contendo 300 mM de Sac e 3,4% de Gly mostrou-se superior na preservação da MOT após 6 h de incubação a 38°C. A redução da concentração de sacarose, de 375 mM para 300 mM, possibilitou uma

melhora geral dos parâmetros pós-descongelamento, especialmente nas amostras descongeladas a 20°C e rediluídas lentamente no protocolo RBV-5.

No presente experimento, o objetivo foi comparar os crioprotetores glicerol e etilenoglicol (EG) adicionados na concentração de 3,4% ao diluente TG com 300 mM de sacarose. Além disso, no intuito de simplificar o método de rediluição, foi testada a rediluição em passo único (R-1) a 38°C, considerando a hipótese de que o EG, como descrito em espermatozoides de outras espécies, permitiria uma rediluição mais rápida que o Gly. Foram colhidos 10 ejaculados de três bodes, retirando-se três alíquotas de cada ejaculado. A pré-diluição e o resfriamento em TG e em TGG seguiram como descrito no Experimento 5. Após o resfriamento e cinco minutos antes da congelamento em vapor de nitrogênio, duas das alíquotas foram adicionadas de meio TG-Sac contendo Gly ou EG e resultando nos seguintes grupos: a) 300 mM Sac/3,4% Gly e b) 300 mM Sac/3,4% EG. As amostras de cada grupo foram descongeladas e rediluídas seguindo duas metodologias: a) descongelamento a 20°C seguida de rediluição progressiva em cinco passos RBV-5 e b) descongelamento a 38°C seguida de rediluição abrupta em um único passo (R-1). A avaliação dos tratamentos com sacarose e do controle sem sacarose foi conduzida após 15 min e 2 e 6 horas de incubação a 38°C, como descrito no Experimento 5.

**4.4.9 Experimento 9 – Congelação em meio TRIS-gema contendo 300 mM de sacarose ou trealose, com ou sem a adição de glicerol, seguida de descongelação e rediluição progressiva em 5 passos RBV-5 a 20°C ou de descongelação e rediluição abrupta em 1 passo a 38°C.**

Foram colhidos nove ejaculados de quatro bodes, retirando-se quatro alíquotas de cada ejaculado. A pré-diluição e o resfriamento em TG e em TGG seguiram como descrito no Experimento 5. Após o resfriamento e cinco minutos antes da congelação em vapor de nitrogênio, três das alíquotas receberam a adição da seguinte combinação de crioprotetores: a) 300 mM Sac/3,4% Gly; b) 300 mM Sac e c) 300 mM trealose (Trea). As amostras de cada grupo foram descongeladas e rediluídas seguindo as metodologias: a) descongelação a 20°C seguida de rediluição em cinco passos RBV-5 a 20°C e b) descongelação a 38°C seguida de rediluição em um único passo (R-1) a 38°C. A avaliação dos tratamentos com e sem sacarose foi conduzida após 15 min e 2 e 6 horas de incubação a 38°C, como descrito no Experimento 5.

#### **4.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS**

A comparação das médias entre os diluentes foi feita utilizando-se a análise de variância do pacote estatístico SAS 8.1, e incluiu os dados de motilidade, vigor espermático e percentual de células com a membrana íntegra. A comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EXPERIMENTO 1 – MOTILIDADE E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS APÓS EXPOSIÇÃO A DIFERENTES SOLUÇÕES HIPEROSMÓTICAS DE SACAROSE EM RINGER-LACTATO E APÓS RETORNO ABRUPTO À ISOSMOLALIDADE

A incubação por 30 min em diluentes hiperosmóticos de sacarose em RL e a posterior rediluição abrupta em RL, foram fatores que influenciaram significativamente ( $p=0,0001$ ) a MOT e a IM.

A incubação em solução hiperosmótica de sacarose por 30 min reduziu fortemente a MOT a partir de uma osmolalidade de 490 mOsm (45,7% do controle), e o percentual de espermatozóides móveis se aproximou de zero quando a concentração de sacarose alcançou 930 mOsm (Tabela 1.1 e Figura 1.1). A IM por sua vez, não foi afetada até a osmolalidade de 930 mOsm (112,6% de espermatozóides com a membrana íntegra se comparados ao controle isosmótico). Perda de IM foi observada apenas no grupo exposto à solução de 2.050 mOsm, que reduziu o número de espermatozóides íntegros à metade do valor do grupo controle (Tabela 1.1 e Figura 1.2).

Trinta minutos após rediluição e retorno à condição isosmótica, o grupo controle apresentou número significativamente maior ( $p\leq 0,01$ ) de espermatozóides móveis se comparado aos outros tratamentos (Tabela 1.1 e Figura 1.1). Em cada um dos grupos experimentais, a MOT observada após a rediluição não diferiu

( $p=0,4156$ ) dos valores observados nas amostras incubadas na solução hiperosmótica. A inibição da MOT causada pela desidratação celular não pôde ser revertida pela rehidratação posterior.

Quanto à IM, o grupo controle mostrou maior percentual de células íntegras ( $p\leq 0,01$ ) que os grupos tratados com sacarose. Entre os grupos expostos à sacarose, não houve diferença de IM em uma faixa de osmolalidade de 490 a 930 mOsm (variou de 38 a 53%). A rediluição abrupta foi visivelmente prejudicial para a IM. Apenas 17% das células inicialmente intactas foram preservadas após a rediluição da amostra que havia sido exposta à solução 2.050 mOsm (Tabela 1.1 e Figura 1.2).

A extensão do dano à membrana apresentou forte influência da osmolalidade prévia ( $p=0,0018$ ). O percentual de células exibindo lesão de membrana após a rediluição foi proporcional à concentração de sacarose experimentada anteriormente, ou seja, quanto maior a desidratação prévia experimentada pelos espermatozoides, maiores as perdas devido à rediluição abrupta.

Tabela 1.1 – Percentuais de motilidade e integridade de membrana avaliados 30 min após exposição de espermatozoides caprinos a soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato e 30 min após a rediluição em Ringer-lactato e retorno à condição isosmótica. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003. Resultados expressos em média e erro padrão (SE). Número de ejaculados = 11

Osmolalidade (mOsm)	*MOT (%)		*IM (%)		*MOT pós-rediluição (%)		*IM pós-rediluição (%)		**Perda de IM (%)	
	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE
260	100 <sup>A</sup>	0,0	100 <sup>a</sup>	0	100 <sup>A</sup>	8	78 <sup>a</sup>	4	-23 <sup>a</sup>	4
490	48 <sup>B</sup>	6	98 <sup>a</sup>	5	47 <sup>B</sup>	5	53 <sup>b</sup>	7	-45 <sup>ab</sup>	6
590	12 <sup>C</sup>	4	111 <sup>a</sup>	7	10 <sup>C</sup>	3	41 <sup>b</sup>	7	-65 <sup>b</sup>	5
690	2 <sup>C</sup>	0,7	108 <sup>a</sup>	6	4 <sup>C</sup>	1	35 <sup>bc</sup>	6	-69 <sup>b</sup>	5
930	0,5 <sup>C</sup>	0,2	111 <sup>a</sup>	7	1 <sup>C</sup>	0,3	38 <sup>b</sup>	5	-67 <sup>b</sup>	4
2050	0,0 <sup>C</sup>	0,0	47 <sup>b</sup>	5	0,0 <sup>C</sup>	0,0	17 <sup>c</sup>	4	-64 <sup>b</sup>	8

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença a  $p \leq 0,01$  pelo teste de Tukey.

\* Valores normalizados para resultados obtidos no grupo controle RL pós-diluição = (valor obtido na solução hiperosmótica/valor obtido no grupo controle) x 100

\*\* Calculada a partir da fórmula = (IM pós-rediluição - IM pós-diluição) / IM pós-diluição x 100

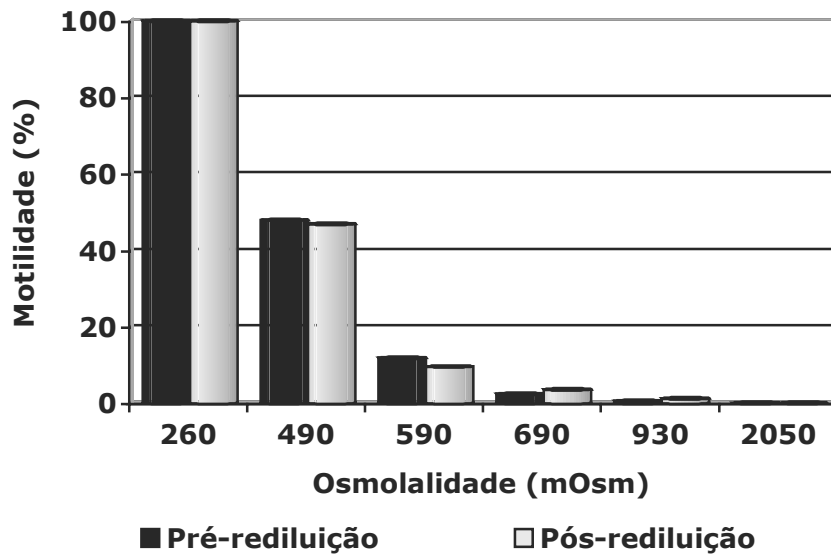


Figura 1.1 – Motilidade avaliada 30 min após exposição de espermatozoides caprinos a soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato e 30 min após a rediluição em Ringer-lactato e retorno à condição isosmótica - Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha - 2003

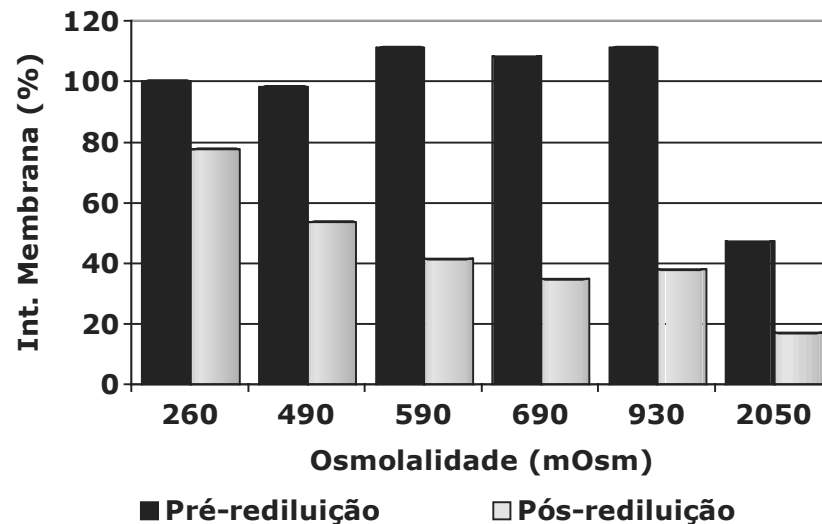


Figura 1.2 – Integridade de membrana avaliada 30 min após exposição de espermatozóides caprinos a soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato e 30 min após a rediluição em Ringer-lactato e retorno à condição isosmótica - Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha - 2003

## 5.2. EXPERIMENTO 2 – EFEITO DA OSMOLALIDADE E DO TEMPO DE INCUBAÇÃO EM SOLUÇÕES HIPEROSMÓTICAS DE SACAROSE EM RINGER-LACTATO SOBRE A INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS

A osmolalidade da solução influenciou fortemente a IM ( $p < 0,0001$ ). O percentual de células espermáticas íntegras em soluções hiperosmóticas de sacarose até 900 mOsm não diferiu do controle ( $p \leq 0,01$ ). A IM foi afetada em soluções a partir de 1500 mOsm, reduzindo-se à metade dos valores do grupo controle na solução 2250 mOsm (Tabela 2.1 e Figura 2.1).



Nos intervalos de incubação de 1, 2, 5 e 10 min à temperatura de 38°C e nos valores de osmolalidade de 260, 900, 1500 e 2250 mOsm aqui estudados, não houve influência significativa do tempo de exposição dos espermatozóides às soluções hiperosmóticas de sacarose em RL, sobre o parâmetro de IM ( $p=0,2807$ ). Os danos à membrana plasmática já estavam presentes com 1 min de exposição à solução hiperosmótica e não se agravaram após 10 min de incubação a 38°C, mesmo em soluções de sacarose de 2250 mOsm (Figura 2.1).

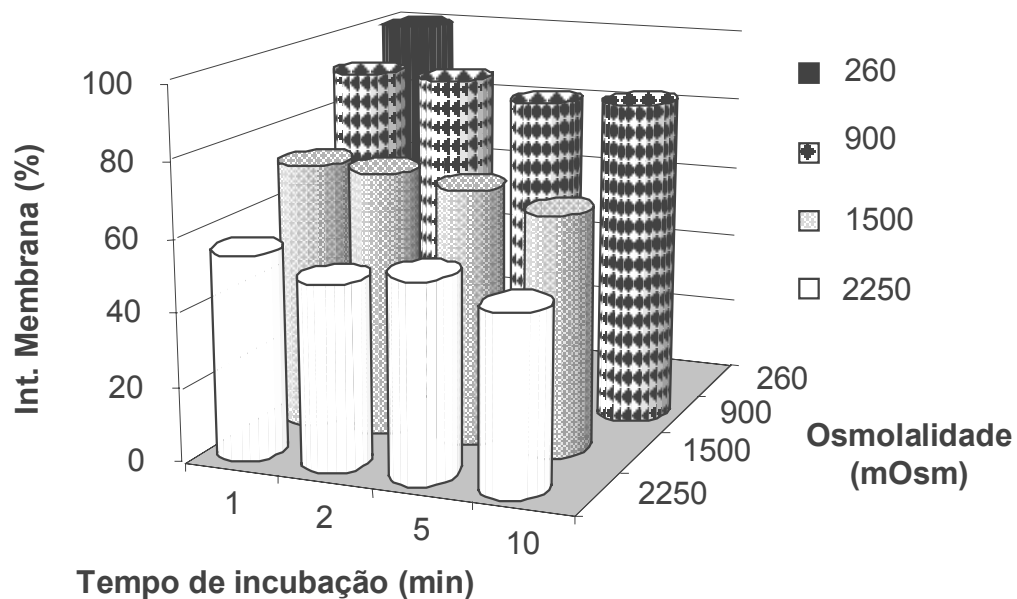


Figura 2.1 – Percentual de integridade de membrana de espermatozóides caprinos após exposição por 1, 2, 5 e 10 min a soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato a 38°C - Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha - 2003

Tabela 2.1 – Percentual de integridade de membrana de espermatozóides caprinos após exposição por 1, 2, 5 e 10 min a soluções hiperosmóticas de sacarose em Ringer-lactato a 38°C. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003. Resultados expressos em média e erro padrão (SE). Número de ejaculados = 11

Osmolalidade (mOsm)	*IM (%)	
	<i>Média</i>	<i>SE</i>
<b>260</b>	100 <sup>A</sup>	0,0
<b>900</b>	89 <sup>A</sup>	6
<b>1500</b>	70 <sup>B</sup>	6
<b>2250</b>	52 <sup>C</sup>	6

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença a  $p \leq 0,01$  pelo teste e Tukey.

\* Integridade de membrana normalizada para o controle = (média do valor obtido na solução hiperosmótica nos três tempos de incubação/valor obtido no grupo controle) x 100

### 5.3 EXPERIMENTO 3 – EFEITO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE AO MEIO DILUIDOR ANDROMED SOBRE A MOTILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS APÓS DESCONGELAÇÃO E REDILUIÇÃO

A concentração de sacarose presente no meio de congelação influenciou significativamente na MOT avaliada após a descongelação e rediluição ( $p=0,0365$ ). A adição de 500 mM de sacarose ao diluente AndroMed reduziu a MOT a 48%. A concentração de 375 mM de sacarose, entretanto, foi bem tolerada pelos espermatozóides e não diferiu em MOT ( $p>0,05$ ) do controle AndroMed sem sacarose (Tabela 3.1).

Tabela 3.1 – Percentual de motilidade pós-descongelamento e rediluição de espermatozoides caprinos congelados em AndroMed contendo três diferentes concentrações de sacarose. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003. Resultados expressos em média e erro padrão (SE). Número de ejaculados = 5

Diluidor	Sacarose (mM)	Temperatura de descongelamento	*Motilidade (%)	
			Média	SE
AndroMed	0	38°C	69 <sup>A</sup>	6
AndroMed	375	4°C	62 <sup>AB</sup>	7
AndroMed	500	4°C	48 <sup>B</sup>	9

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença a  $p \leq 0,05$ .

\* Valores normalizados para a motilidade no grupo controle pré-congelamento = (valor obtido pós-descongelamento/valor da amostra nativa pré-congelamento) x 100

#### 5.4 EXPERIMENTO 4 – EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO AO DILUIDOR TRIS-GEMA-GLICEROL ADICIONADO DE 375 MM DE SACAROSE E DA TEMPERATURA DE DESCONGELAMENTO SOBRE A MOTILIDADE, VIGOR E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS

O tempo de exposição à concentração de 375 mM de sacarose no diluente TGG antes da congelamento e a temperatura de descongelamento e rediluição influenciou significativamente a MOT, o VIG e a IM dos espermatozoides caprinos ( $p < 0,0001$ ).

A congelamento do sêmen em vapor de nitrogênio 2 min após ter recebido a adição de TGG com sacarose, combinada à descongelamento e rediluição a 4°C, apresentou os melhores resultados de MOT dentre os grupos tratados com sacarose e resultou em MOT similar à do grupo controle ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4.1 e Figura 4.1). O

VIG não diferiu entre os tempos de incubação, mas entre os grupos tratados, foi favorecido pela descongelação à temperatura de 4°C.

A IM, de maneira inversa ao que ocorreu na MOT, mostrou-se melhor nas amostras descongeladas a 38°C, chegando a ser significativamente superior ao controle nos tratamentos de 2 e 5 min de exposição pré-congelação ( $p \leq 0,05$ ). Nas amostras descongeladas e rediluídas a 4°C, a IM não foi afetada até o tempo de 5 min de exposição à sacarose (Tabela 4.1 e Figura 4.2).

Tabela 4.1 – Motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozoides caprinos congelados após 2, 5 e 10 min de exposição ao diluidor TRIS-gema-glicerol contendo 375 mM de sacarose e descongelados e rediluídos a 4 e 38°C. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003. Resultados expressos em média e erro padrão (SE). Número de ejaculados = 16

Diluidor	Duração da exposição (min)	Temperatura de descongelação (°C)	*MOT (%)		*VIG (%)		**IM (%)	
			Média	SE	Média	SE	Média	SE
TGG	0	38	57 <sup>A</sup>	4	76 <sup>A</sup>	4	100 <sup>CD</sup>	0
TGG – Sac 375	2	4	47 <sup>AB</sup>	4	58 <sup>B</sup>	4	107 <sup>BCD</sup>	6
	5	4	40 <sup>BC</sup>	4	57 <sup>B</sup>	4	95 <sup>ED</sup>	7
	10	4	36 <sup>BC</sup>	5	53 <sup>B</sup>	4	85 <sup>E</sup>	7
	2	38	27 <sup>CD</sup>	4	35 <sup>C</sup>	5	124 <sup>A</sup>	7
	5	38	21 <sup>D</sup>	3	29 <sup>C</sup>	4	118 <sup>AB</sup>	6
	10	38	20 <sup>D</sup>	4	26 <sup>C</sup>	4	112 <sup>ABC</sup>	8

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença a  $p \leq 0,05$  pelo teste de Tukey.

\* Valores normalizados para o grupo controle pré-congelação = (valor obtido pós-descongelação/valor da amostra nativa pré-congelação) x 100

\*\* Valores normalizados para grupo controle TGG pós-descongelação = (valor obtido pós-descongelação/valor do grupo controle TGG pós-descongelação) x 100

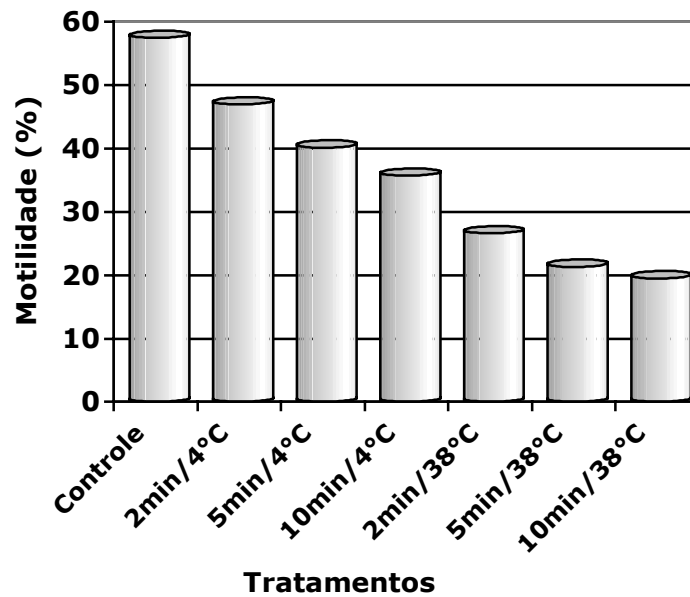


Figura 4.1 - Motilidade de espermatozoides caprinos congelados após 2, 5 e 10 min de exposição ao diluidor TRIS-gema-glicerol contendo 375 mM de sacarose e descongelados e rediluídos a 4 e 38°C - Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha - 2003

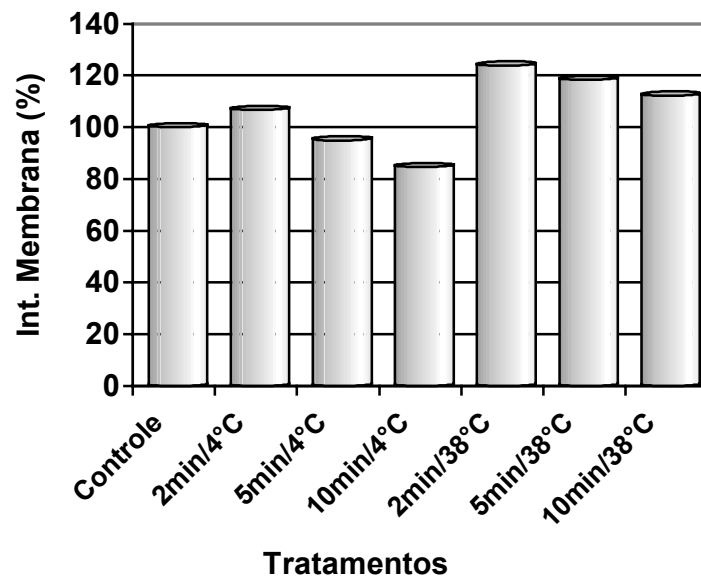


Figura 4.2 - Integridade de membrana de espermatozoides caprinos congelados após 2, 5 e 10 min de exposição ao diluidor TRIS-gema-glicerol contendo 375 mM de sacarose e descongelados e rediluídos a 4 e 38°C - Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha - 2003

Como não houve interação entre o tempo de exposição à sacarose e a temperatura de descongelamento em nenhum dos parâmetros pós-descongelamento aqui estudados ( $p=0,7841$  para MOT,  $p=0,7295$  para VIG e  $p=0,0814$  para IM), foi possível agrupar os resultados e avaliar separadamente os efeitos do tempo de incubação (sem considerar a temperatura de descongelamento) e os efeitos da temperatura de descongelamento (sem considerar o tempo de incubação).

As comparações entre os tratamentos contendo sacarose mostraram a superioridade nos parâmetros de MOT e IM no grupo de 2 min de exposição ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 4.2). Quando apenas o efeito da temperatura foi analisado, a MOT e o VIG foram melhores na descongelamento a 4°C ( $p < 0,0001$ ), enquanto a IM foi melhor após descongelamento a 38°C (Tabela 4.3).

Tabela 4.2 – Motilidade, vigor e integridade de membrana pós-descongelamento e rediluição de espermatozoides caprinos congelados após 2, 5 e 10 min de exposição ao diluidor TRIS-gema-glicerol contendo 375 mM de sacarose - Excluído o efeito da temperatura de descongelamento. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003 Número de ejaculados = 32. Resultados expressos em média e erro padrão (SE).

Duração da exposição (min)	*MOT (%)		*VIG (%)		**IM (%)	
	Média	SE	Média	SE	Média	SE
2	37 <sup>A</sup>	3	47 <sup>A</sup>	4	115 <sup>A</sup>	5
5	31 <sup>AB</sup>	3	43 <sup>A</sup>	4	107 <sup>B</sup>	5
10	28 <sup>B</sup>	3	39 <sup>A</sup>	4	98 <sup>C</sup>	6

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença a  $p \leq 0,05$  pelo teste de Tukey.

\* Valores normalizados para o grupo controle pré-congelamento = (valor obtido pós-descongelamento/valor da amostra nativa pré-congelamento) x 100

\*\* Valores normalizados para grupo controle TGG pós-descongelamento = (valor obtido pós-descongelamento/valor do grupo controle TGG pós-descongelamento) x 100

OBS: Os valores das duas temperaturas de descongelamento foram agrupados por tempo de exposição ao diluidor contendo sacarose.

Tabela 4.3 – Motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozoides caprinos congelados em diluidor TRIS-gema-glicerol contendo 375 mM de sacarose após-descongelamento e rediluição a 4 e a 38°C - Excluído o efeito do tempo de exposição à sacarose. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2003. Número de ejaculados = 48. Resultados expressos em média e erro padrão (SE).

Temperatura de descongelamento (°C)	*MOT (%)		*VIG (%)		**IM (%)	
	Média	SE	Média	SE	Média	SE
4	41 <sup>A</sup>	3	56 <sup>A</sup>	2	95 <sup>B</sup>	4
38	23 <sup>B</sup>	2	30 <sup>B</sup>	3	118 <sup>A</sup>	4

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença a  $p < 0,0001$  pelo teste de Tukey.

\* Valores normalizados para o grupo controle pré-congelamento = (valor obtido pós-descongelamento/valor da amostra nativa pré-congelamento) x 100

\*\* Valores normalizados para grupo controle TGG pós-descongelamento = (valor obtido pós-descongelamento/valor do grupo controle TGG pós-descongelamento) x 100

OBS: Os valores dos três tempos de exposição ao diluidor contendo sacarose foram agrupados por temperatura de descongelamento.

## 5.5 EXPERIMENTO 5 – EFEITO DA CONGELAÇÃO EM MEIO TRIS-GEMA CONTENDO SACAROSE (375 MM) E CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE GLICEROL SOBRE A MOTILIDADE, VIGOR E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS

A concentração de glicerol presente no diluidor TG com sacarose afetou de forma significativa a MOT ( $p < 0,0001$ ), o VIG ( $p < 0,0001$ ) e a IM ( $p = 0,0009$ ) do sêmen caprino pós-descongelamento e rediluição. A MOT pós-descongelamento foi significativamente melhor ( $p \leq 0,05$ ) nos grupos congelados com 375 mM de sacarose e 1,7 ou 3,4% de glicerol, quando comparada à do grupo controle TGG, com 6,8% de glicerol e sem sacarose, e à do grupo com sacarose e 6,8% de glicerol. Não

houve diferença entre os grupos quanto ao VIG ( $p=0,0862$ ) (Tabela 5.1 e Figura 5.1). A IM pós-descongelamento do grupo contendo sacarose e 1,7% de glicerol foi significativamente melhor ( $p\leq 0,05$ ) que a do grupo controle TGG (Tabela 5.1 e Figura 5.2).

Após 2 horas de incubação a 38°C, a concentração de glicerol presente no diluente de congelamento influenciou a MOT ( $p=0,0022$ ) e o VIG ( $p=0,0053$ ). O sêmen congelado em diluidor contendo sacarose e 6,8% de glicerol foi significativamente inferior às amostras com concentração reduzida de glicerol. Decorridas 6 horas de incubação do sêmen a 38°C, houve diferença na MOT ( $p=0,0220$ ) e no VIG ( $p=0,0160$ ) entre os tratamentos. A MOT dos grupos contendo concentrações reduzidas de glicerol e do grupo controle TGG foi melhor que no grupo contendo sacarose e 6,8% de glicerol. O VIG foi favorecido pela congelamento em diluidor com sacarose e 1,7% de glicerol (Tabela 5.1).



Tabela 5.1 – Motilidade, vigor e integridade de membrana de espermatozoides caprinos após descongelação e motilidade e vigor após 2 e 6 h de incubação a 38°C - Efeito de três diferentes concentrações de glicerol (1,7, 3,4 e 6,8%) adicionadas ao diluente TRIS-gema contendo 375 mM de sacarose, comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha, 2003. Resultados expressos em média e erro padrão (SE). Número de ejaculados = 10.

Diluidor	Glicerol (%)	*MOT pós-desc (%)		*VIG pós-desc (%)		**IM pós-desc (%)		*MOT 2hs/38°C (%)		*VIG 2hs/38°C (%)		*MOT 6hs/38°C (%)		*VIG 6hs/38°C (%)	
		Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE
Controle TGG	6,8	52 <sup>B</sup>	5	63 <sup>A</sup>	9	100 <sup>BC</sup>	0	31 <sup>A</sup>	7	33 <sup>AB</sup>	7	8 <sup>A</sup>	4	5 <sup>AB</sup>	3
		65 <sup>A</sup>	4	60 <sup>A</sup>	2	187 <sup>A</sup>	37	35 <sup>A</sup>	7	40 <sup>A</sup>	3	8 <sup>A</sup>	3	8 <sup>A</sup>	2
		63 <sup>A</sup>	4	58 <sup>A</sup>	2	165 <sup>AB</sup>	30	34 <sup>A</sup>	5	41 <sup>A</sup>	2	7 <sup>A</sup>	3	7 <sup>AB</sup>	2
TG+375 mM Sac	6,8	37 <sup>C</sup>	6	49 <sup>A</sup>	3	91 <sup>C</sup>	7	9 <sup>B</sup>	2	28 <sup>B</sup>	2	0,3 <sup>B</sup>	0,2	1 <sup>B</sup>	1

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença a  $p \leq 0,05$  pelo teste de Tukey.

\* Valores normalizados para o grupo controle pré-congelação = (valor obtido pós-descongelação/valor da amostra nativa pré-congelação) x 100

\*\* Valores normalizados para grupo controle TGG pós-descongelação = (valor obtido pós-descongelação/valor do grupo controle TGG pós-descongelação) x 100

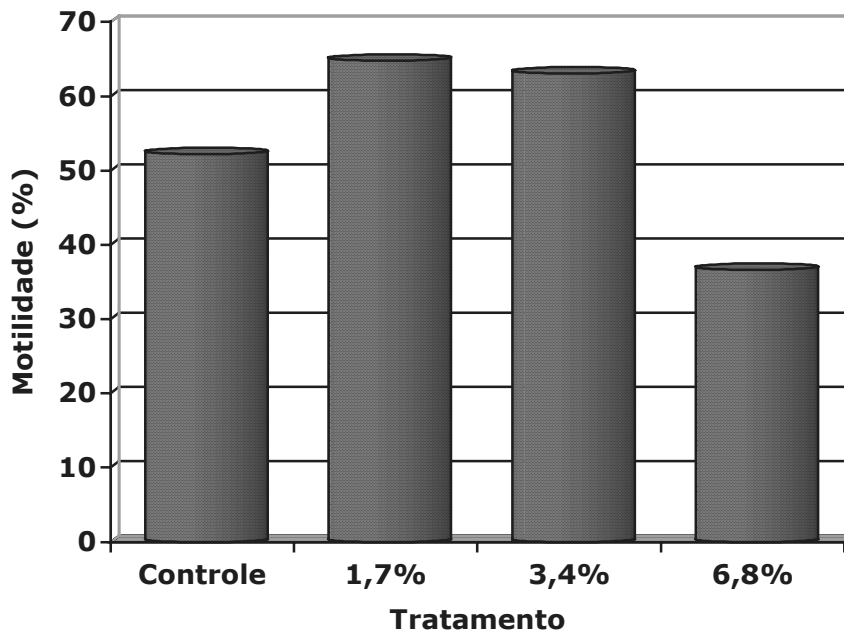


Figura 5.1 – Motilidade de espermatozoides caprinos pós-descongelamento - Efeito de três diferentes concentrações de glicerol (1,7, 3,4 e 6,8%) adicionadas ao diluente TRIS-gema contendo 375 mM de sacarose, comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha - 2003

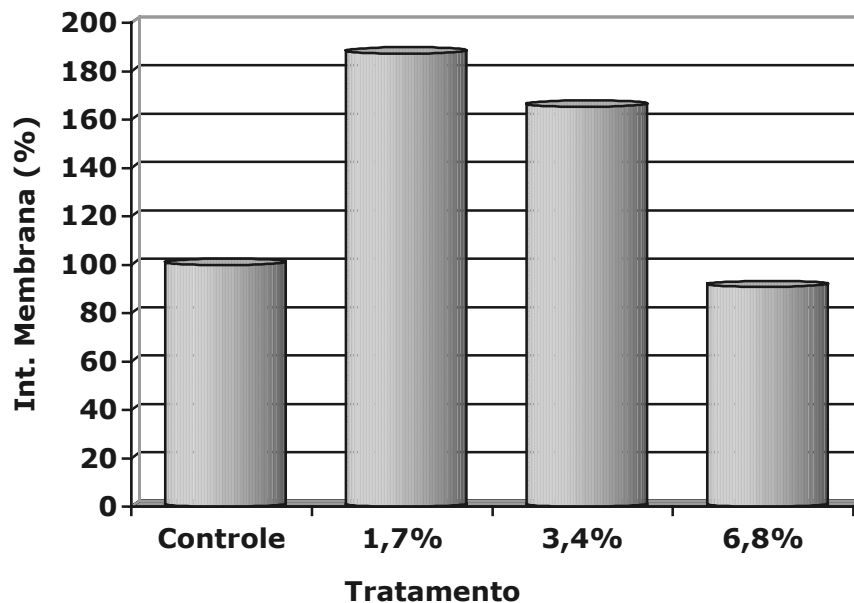


Figura 5.2 – Integridade de membrana de espermatozoides caprinos pós-descongelamento - Efeito de três diferentes concentrações de glicerol (1,7, 3,4 e 6,8%) adicionadas ao diluente TRIS-gema contendo 375 mM de sacarose, comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha - 2003

## 5.6 EXPERIMENTO 6 – EFEITO DA VELOCIDADE DE REDILUIÇÃO PÓS-DESCONGELAÇÃO SOBRE A MOTILIDADE, O VIGOR E A INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE SÊMEN CAPRINO CONGELADO EM DILUENTE TRIS-GEMA CONTENDO SACAROSE (375 MM) E CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE GLICEROL

Não houve interação entre a velocidade de rediluição e a concentração de Gly para nenhum dos parâmetros espermáticos aqui avaliados ( $p > 0,05$ ) assim, decidiu-se por utilizar a média obtida nas diferentes concentrações de Gly agrupadas por velocidade de rediluição.

Os parâmetros de MOT e IM não foram influenciados pelo tipo de rediluição ( $p = 0,8945$  e  $p = 0,7270$ , respectivamente), quando avaliados até 15 min após a rediluição, enquanto o VIG foi afetado pela velocidade de rediluição ( $p = 0,0245$ ). A rediluição RBV-5, em que a osmolalidade decrescia 245 mOsm no primeiro passo, resultou em VIG significativamente melhor que a rediluição R-5, na qual a osmolalidade decrescia em cinco passos fixos de 120 mOsm ( $p \leq 0,05$ ), mas não diferiu da rediluição em três passos R-3 (decrécimo de 200 mOsm/passos) (Tabela 6.1). Nos grupos R-5 e R-3 foram observados, em algumas amostras, grupos de espermatozoides aderidos entre si pela extremidade da cauda.

Após 2 horas de incubação, observou-se um efeito desfavorável sobre a MOT da rediluição R-3 ( $p = 0,0141$ ), mas o VIG não diferiu entre os tratamentos ( $p = 0,0655$ ). Após 6 horas, a MOT não diferiu ( $p = 0,1348$ ), mas o VIG mostrou diferença

significativa entre as rediluições ( $p=0,0396$ ), onde os melhores resultados foram obtidos na rediluição RBV-5.

Tabela 6.1 – Motilidade, vigor e integridade de membrana após descongelamento e motilidade e vigor após 2 e 6 h de incubação a 38°C de espermatozoides caprinos congelados em diluente TRIS-gema contendo 375 mM de sacarose e 1,7 a 6,8% de glicerol e descongelados e rediluídos a 4°C em três diferentes velocidades de rediluição: 5 passos baseados no volume, 5 passos de 120 mOsm de redução na osmolalidade e 3 passos de 200 mOsm de redução na osmolalidade. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha, 2003. Resultados expressos em média e erro padrão (SE). Número de ejaculados = 12

Rediluição	*MOT pós-desc (%)		*IM pós-desc (%)		*VIG pós-desc (%)		*MOT 2hs/38°C (%)		*VIG 2hs/38°C (%)		*MOT 6hs/38°C (%)		*VIG 6hs/38°C (%)	
	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE
<b>RBV-5</b>	56 <sup>A</sup>	5	202 <sup>A</sup>	31	59 <sup>A</sup>	3	28 <sup>A</sup>	3	41 <sup>A</sup>	3	7 <sup>A</sup>	3	9 <sup>A</sup>	2
<b>R-5</b>	55 <sup>A</sup>	4	213 <sup>A</sup>	33	51 <sup>B</sup>	3	30 <sup>A</sup>	4	35 <sup>A</sup>	3	5 <sup>A</sup>	3	5 <sup>AB</sup>	2
<b>R-3</b>	55 <sup>A</sup>	4	201 <sup>A</sup>	33	55 <sup>AB</sup>	2	19 <sup>B</sup>	5	33 <sup>A</sup>	3	2 <sup>A</sup>	1	2 <sup>B</sup>	1

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença a  $p \leq 0,05$ .

\* Valores normalizados para o grupo controle pré-congelamento = (valor obtido pós-descongelamento/valor da amostra nativa pré-congelamento) x 100

## 5.7 EXPERIMENTO 7 – EFEITO DA CONGELAÇÃO EM MEIO TRIS-GEMA CONTENDO CONCENTRAÇÕES REDUZIDAS DE SACAROSE E DE GLICEROL, E DA TEMPERATURA E VELOCIDADE DE REDILUIÇÃO PÓS-DESCONGELAÇÃO SOBRE A MOTILIDADE, VIGOR E INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS

Nos grupos congelados com sacarose, a MOT, a IM e o VIG pós-descongelação não foram afetados ( $p=0,0838$ ,  $p=0,2226$  e  $p=0,3759$ , respectivamente) pelo tratamento utilizado (efeito combinado diluente+velocidade de rediluição), mas estes grupos mostraram-se em geral melhores que o diluente controle TGG (Tabela 7.1, Figura 7.1 e 7.2). A MOT após 2 h de incubação foi favorecida ( $p=0,0500$ ) pelo tratamento 300 mM Sac/1,7% Gly, rediluído a 20°C no protocolo RBV-5 (51% vs 34% do grupo controle). O VIG após 2 horas de incubação não foi afetado pelo tratamento ( $p=0,0864$ ). Decorridas 6 horas de incubação a 38°C, a MOT ( $p=0,0055$ ) e o VIG ( $p=0,0089$ ) foram melhores no grupo 300 mM Sac/3,4% Gly, rediluído a 20°C no protocolo RBV-5 (33% e 26%, respectivamente).

Tabela 7.1 – Motilidade, integridade de membrana e vigor após descongelamento, motilidade após 2 h e motilidade e vigor após 6 h de incubação a 38°C de espermatozoides caprinos - Efeito da congelamento em meio TRIS-gema adicionado de duas diferentes concentrações de sacarose (375 e 300 mM) e de glicerol (1,7 e 3,4%), e da descongelamento e rediluição em duas diferentes temperaturas (4 e 20°C) e velocidades de rediluição (RBV-5 e R-2), comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha, 2004. Resultados expressos em média e erro padrão (SE). Número de ejaculados = 15.

Diluente- Sac (mM)	Gly (%)	Diluição/ temperatura	*MOT pós-desc (%)		**IM pós-desc (%)		*VIG pós-desc (%)		*MOT 2hs/38°C (%)		*VIG 2hs/38°C (%)		*MOT 6hs/38°C (%)		*VIG 6hs/38°C (%)	
			Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE
TGG-0	6,8	RBV-5 / 38°C	47 <sup>AB</sup>	6	100 <sup>B</sup>	0	69 <sup>A</sup>	3	34 <sup>C</sup>	4	54 <sup>AB</sup>	6	15 <sup>D</sup>	4	10 <sup>C</sup>	4
TG-375	1,7	RBV-5 / 4°C	45 <sup>B</sup>	5	195 <sup>AB</sup>	30	62 <sup>A</sup>	4	34 <sup>C</sup>	4	44 <sup>BC</sup>	5	16 <sup>CD</sup>	4	12 <sup>C</sup>	3
		RBV-5 / 20°C	48 <sup>AB</sup>	3	234 <sup>A</sup>	34	66 <sup>A</sup>	4	40 <sup>ABC</sup>	4	54 <sup>AB</sup>	5	22 <sup>BCD</sup>	4	16 <sup>BC</sup>	4
		R-2 / 20°C	58 <sup>AB</sup>	5	213 <sup>A</sup>	35	70 <sup>A</sup>	3	42 <sup>ABC</sup>	4	58 <sup>A</sup>	7	27 <sup>ABC</sup>	3	20 <sup>ABC</sup>	4
		RBV-5 / 4°C	51 <sup>AB</sup>	5	224 <sup>A</sup>	35	63 <sup>A</sup>	4	36 <sup>BC</sup>	4	48 <sup>BC</sup>	6	20 <sup>BCD</sup>	4	13 <sup>C</sup>	3
TG-300	3,4	RBV-5 / 20°C	60 <sup>A</sup>	5	236 <sup>A</sup>	41	72 <sup>A</sup>	4	46 <sup>AB</sup>	4	61 <sup>A</sup>	6	33 <sup>A</sup>	4	26 <sup>A</sup>	5
		R-2 / 20°C	62 <sup>A</sup>	5	181 <sup>AB</sup>	14	69 <sup>A</sup>	4	45 <sup>ABC</sup>	3	57 <sup>A</sup>	6	28 <sup>AB</sup>	5	17 <sup>ABC</sup>	4
		RBV-5 / 4°C	56 <sup>AB</sup>	7	226 <sup>A</sup>	34	62 <sup>A</sup>	4	39 <sup>BC</sup>	3	53 <sup>AB</sup>	5	20 <sup>BCD</sup>	4	15 <sup>BC</sup>	3
TG-300	1,7	RBV-5 / 20°C	57 <sup>AB</sup>	4	226 <sup>A</sup>	37	69 <sup>A</sup>	4	51 <sup>A</sup>	4	62 <sup>A</sup>	6	29 <sup>AB</sup>	4	22 <sup>AB</sup>	4
		R-2 / 20°C	60 <sup>A</sup>	4	249 <sup>A</sup>	39	70 <sup>A</sup>	4	46 <sup>AB</sup>	5	58 <sup>A</sup>	7	28 <sup>AB</sup>	4	23 <sup>AB</sup>	5

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença a  $p \leq 0,05$  pelo teste de Tukey.

\* Valores normalizados para o grupo controle pré-congelamento = (valor obtido pós-descongelamento/valor da amostra nativa pré-congelamento) x 100

\*\* Valores normalizados para grupo controle TGG pós-descongelamento = (valor obtido pós-descongelamento/valor do grupo controle TGG pós-descongelamento) x 100

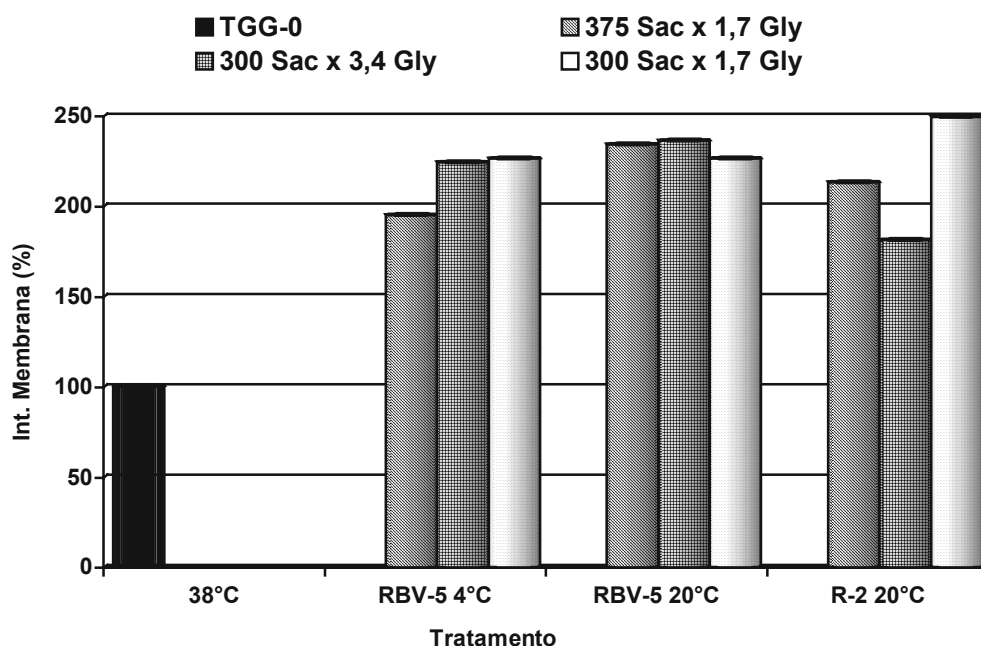


Figura 7.1 – Integridade de membrana de espermatozoides caprinos pós-descongelamento - Efeito da congelamento em meio TRIS-gema adicionado de duas diferentes concentrações de sacarose (375 e 300 mM) e de glicerol (1,7 e 3,4%), e da descongelamento e rediluição em duas diferentes temperaturas (4 e 20°C) e velocidades de rediluição (RBV-5 e R-2), comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha - 2004

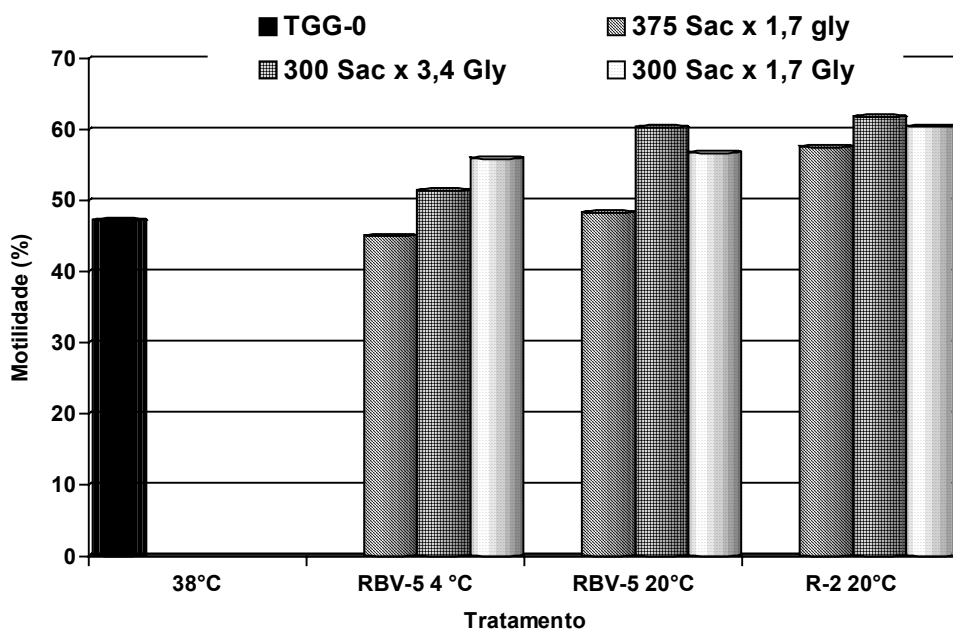


Figura 7.2 – Motilidade de espermatozoides caprinos pós-descongelamento - Efeito da congelamento em meio TRIS-gema adicionado de duas diferentes concentrações de sacarose (375 e 300 mM) e de glicerol (1,7 e 3,4%), e da descongelamento e rediluição em duas diferentes temperaturas (5 e 20°C) e velocidades de rediluição (RBV-5 e R-2), comparadas ao diluente controle TRIS-gema-glicerol sem adição de sacarose e contendo 6,8% de glicerol. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik - Goettingen – Alemanha - 2004



Quando se avaliou em separado os efeitos da concentração de glicerol, do número de passos da rediluição e da interação concentração de Gly x velocidade de rediluição sobre os parâmetros espermáticos aqui estudados, somente a interação Gly x velocidade de rediluição afetou a IM ( $p=0,0113$ ). Quando a concentração de Gly do diluente foi menor (1,7%), uma rediluição em duas etapas permitiu boas taxas de preservação da membrana celular, em contra partida, uma rediluição mais lenta, em cinco passos, foi favorável quando a concentração de glicerol no meio foi 3,4%. A velocidade de rediluição, como efeito isolado, não influenciou a IM ( $p>0,05$ ). O número de passos de rediluição foi o único fator que influenciou a MOT e o VIG ( $p=0,0058$  e  $p=0,0321$ , respectivamente), onde dois passos foram mais benéficos que cinco passos de rediluição. A MOT e o VIG às 2 e 6 horas de incubação não foram influenciados ( $p>0,05$ ) pelos fatores concentração de glicerol, velocidade de rediluição ou pela interação destes dois fatores.

Quando apenas o efeito da concentração de sacarose e de sua interação com a velocidade de rediluição foram considerados, a IM e a MOT pós-descongelação, a MOT 2 h e a MOT 6 h foram influenciadas pela concentração de sacarose ( $p=0,0076$ ,  $p=0,0005$ ,  $p=0,0077$  e  $p=0,0441$ , respectivamente), mas não pela interação sacarose x número de passos ( $p>0,05$ ). A adição de 300 mM do açúcar foi melhor para MOT e IM que 375 mM. No momento pós-descongelação, o VIG não diferiu entre os grupos, mas com 2 e 6 h de incubação, foi negativamente afetado pela concentração de 375 mM de sacarose ( $p=0,0137$ ).

Quando se analisou em separado os efeitos da temperatura e da interação concentração de sacarose x temperatura, a IM não foi influenciada dentro da faixa de osmolalidade testada ( $p>0,05$ ). A temperatura de descongelação e rediluição

afetou a MOT ( $p=0,0114$ ), o VIG ( $p=0,0004$ ), a MOT 2 h ( $p<0,0001$ ) e 6 h ( $p=0,0006$ ) e o VIG 2 e 6 h ( $p=0,0005$ ), onde a temperatura de 20°C foi sempre melhor que 4°C.

#### 5.8 EXPERIMENTO 8 – EFEITO DA CONGELAÇÃO EM MEIO TRIS-GEMA CONTENDO 300 MM DE SACAROSE E 3,4% DE GLICEROL OU ETILENOGLICOL, SEGUIDA DE DESCONGELAÇÃO E REDILUIÇÃO EM CINCO PASSOS (RBV-5) A 20°C OU EM UM PASSO (R-1) A 38°C, SOBRE A MOTILIDADE, O VIGOR E A INTEGRIDADE DE MEMBRANA DE ESPERMATOZÓIDES CAPRINOS

A IM não diferiu entre os grupos contendo sacarose como crioprotetor não-permeante e Gly ou EG como crioprotetor permeante, mas estes foram significativamente melhores que o controle ( $p=0,0009$ ) (Tabela 8.1). Todos os outros parâmetros estudados não foram afetados pelo tratamento ( $p=0,2024$ ,  $p=0,4198$ ,  $p=0,4969$ ,  $p=0,3677$ ,  $p=0,0975$  e  $p=0,5398$ , respectivamente para MOT e VIG pós-descongelação, MOT e VIG 2 h, MOT e VIG 6 h).

Tabela 8.1 – Motilidade, IM e vigor de sêmen caprino congelado em meio TG contendo sacarose, adicionado de glicerol ou etilenoglicol, e descongelado e rediluído em cinco passos (RBV-5) a 20°C ou em um passo (R-1) a 38°C. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2004. Resultados expressos em média e erro padrão (SE). Número de ejaculados = 10

Diluidor	Crioprotetor permeante	Diluição/ temperatura	*MOT pós-desc (%)	**IM pós-desc (%)	*VIG pós-desc (%)	*MOT 2hs/38°C (%)			*VIG 2hs/38°C (%)			*MOT 6hs/38°C (%)			*VIG 6hs/38°C (%)		
						Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE
<b>TGG</b>	Gly	<b>RBV-5 / 38°C</b>	68 <sup>A</sup>	8	100 <sup>B</sup>	0	66 <sup>A</sup>	6	60 <sup>A</sup>	6	40 <sup>A</sup>	5	16 <sup>A</sup>	6	10 <sup>A</sup>	4	
<b>TG-Sac 300</b>	Gly	<b>RBV-5 / 20°C</b>	56 <sup>A</sup>	9	177 <sup>A</sup>	34	58 <sup>A</sup>	7	57 <sup>A</sup>	8	36 <sup>A</sup>	5	22 <sup>A</sup>	7	11 <sup>A</sup>	4	
<b>TG-Sac 300</b>	EG	<b>RBV-5 / 20°C</b>	55 <sup>A</sup>	7	172 <sup>A</sup>	28	58 <sup>A</sup>	2	57 <sup>A</sup>	6	42 <sup>A</sup>	4	28 <sup>A</sup>	9	12 <sup>A</sup>	4	
<b>TG-Sac 300</b>	Gly	<b>R-1 / 38°C</b>	59 <sup>A</sup>	5	183 <sup>A</sup>	28	63 <sup>A</sup>	3	52 <sup>A</sup>	5	43 <sup>A</sup>	4	33 <sup>A</sup>	8	15 <sup>A</sup>	5	
<b>TG-Sac 300</b>	EG	<b>R-1 / 38°C</b>	54 <sup>A</sup>	6	163 <sup>A</sup>	28	60 <sup>A</sup>	10	49 <sup>A</sup>	5	36 <sup>A</sup>	4	26 <sup>A</sup>	7	11 <sup>A</sup>	3	

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença a p≤0,05 pelo teste de Tukey.

\* Valores normalizados para o grupo controle pré-congelação = (valor obtido pós-descongelação/valor da amostra nativa pré-congelação) x 100

\*\* Valores normalizados para grupo controle TGG pós-descongelação = (valor obtido pós-descongelação/valor do grupo controle TGG pós-descongelação) x 100

## 5.9 EXPERIMENTO 9 – CONGELAÇÃO EM MEIO TRIS-GEMA CONTENDO 300 MM DE SACAROSE OU TREALOSE, COM OU SEM A ADIÇÃO DE GLICEROL, SEGUIDA DE DESCONGELAÇÃO E REDILUIÇÃO EM CINCO PASSOS (RBV-5) A 20°C OU EM UM PASSO (R-1) A 38°C

A IM mostrou uma clara superioridade ( $p < 0,0001$ ) dos diluentes contendo dissacarídeos em relação ao controle. Entre os grupos congelados na presença de dissacarídeos, o grupo Trea-300 descongelado a 38°C e rediluído em um passo foi superior ao grupo 300 mM Sac/3,4% Gly descongelado no protocolo RBV-5 a 20°C (Tabela 9.1).

A MOT ( $p = 0,2528$ ) e o VIG ( $p = 0,2449$ ) pós-descongelação não foram influenciados pelo tratamento. Observou-se uma clara vantagem dos grupos contendo trealose, independente do protocolo de descongelação, nos parâmetros de MOT 2 e 6 h ( $p = 0,0038$ ) e VIG 2 e 6 h ( $p = 0,0481$ ) (Tabela 9.1).

Tabela 9.1 – Motilidade, IM e vigor de sêmen caprino congelado em meio TRIS-gema contendo 300 mM de sacarose adicionado ou não de 3,4% de glicerol, ou contendo 300 mM de trealose sem adição de glicerol, e descongelado e rediluído em cinco passos (RBV-5) a 20°C ou em um passo (R-1) a 38°C. Institut fuer Tierzucht und Haustiergenetik – Goettingen – Alemanha, 2004. Resultados expressos em média e erro padrão (SE). Número de ejaculados = 9

Diluidor	Gly (%)	Diluição/ temperatura	*MOT pós-desc (%)		**IM pós-desc (%)		*VIG pós-desc (%)		*MOT 2hs/38°C (%)		*VIG 2hs/38°C (%)		*MOT 6hs/38°C (%)		*VIG 6hs/38°C (%)	
			Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE	Média	SE
TGG	6,8	RBV-5 / 38°C	50 <sup>A</sup>	9	100 <sup>C</sup>	0	51 <sup>A</sup>	5	43 <sup>B</sup>	10	43 <sup>B</sup>	5	26 <sup>B</sup>	7	14 <sup>C</sup>	3
TG -Sac 300	3,4	RBV-5 / 20°C	69 <sup>A</sup>	18	205 <sup>B</sup>	21	54 <sup>A</sup>	4	56 <sup>AB</sup>	6	41 <sup>B</sup>	4	40 <sup>AB</sup>	11	15 <sup>BC</sup>	4
TG-Sac 300	0	RBV-5 / 20°C	57 <sup>A</sup>	12	247 <sup>AB</sup>	26	58 <sup>A</sup>	5	72 <sup>AB</sup>	13	48 <sup>AB</sup>	4	45 <sup>AB</sup>	11	17 <sup>ABC</sup>	4
TG-Trea 300	0	RBV-5 / 20°C	71 <sup>A</sup>	12	281 <sup>AB</sup>	49	58 <sup>A</sup>	4	74 <sup>A</sup>	14	52 <sup>A</sup>	4	56 <sup>A</sup>	9	26 <sup>A</sup>	3
TG-Sac 300	3,4	R-1 / 38°C	65 <sup>A</sup>	11	234 <sup>AB</sup>	34	56 <sup>A</sup>	4	59 <sup>AB</sup>	11	43 <sup>B</sup>	4	48 <sup>AB</sup>	12	17 <sup>ABC</sup>	4
TG-Sac 300	0	R-1 / 38°C	60 <sup>A</sup>	8	266 <sup>AB</sup>	31	55 <sup>A</sup>	5	57 <sup>AB</sup>	8	48 <sup>AB</sup>	6	42 <sup>AB</sup>	11	19 <sup>AB</sup>	4
TG-Trea 300	0	R-1 / 38°C	69 <sup>A</sup>	8	320 <sup>A</sup>	56	60 <sup>A</sup>	4	74 <sup>A</sup>	10	54 <sup>A</sup>	4	54 <sup>AB</sup>	11	26 <sup>A</sup>	4

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença a  $p \leq 0,05$  pelo teste de Tukey.

\* Valores normalizados para o grupo controle pré-congelado = (valor obtido pós-descongelado/valor da amostra nativa pré-congelado) x 100

\*\* Valores normalizados para grupo controle TGG pós-descongelado = (valor obtido pós-descongelado/valor do grupo controle TGG pós-descongelado) x 100

## 6 DISCUSSÃO

A discussão foi dividida por experimento para facilitar a comparação da literatura com os resultados obtidos em cada experimento.

### 6.1 EXPERIMENTO 1

A criopreservação de sêmen caprino ainda não alcançou um estágio que possa ser considerado satisfatório. Os resultados de fertilidade pós-inseminação com sêmen congelado nesta espécie ainda estão bem abaixo dos obtidos na espécie bovina. Desde o trabalho pioneiro de Roy (1957), a congelação de sêmen caprino suscita discussões sobre a necessidade ou não da remoção do plasma seminal das amostras a serem congeladas. Autores, da aqui chamada linha francesa, defendem a idéia de que a presença de uma fosfolipase no plasma seminal caprino causaria injúria aos espermatozóides se estes fossem congelados em diluente contendo leite ou gema de ovo (revisado em COMBARNOUS, 1998). Diversos outros autores, entretanto, não encontraram vantagem na remoção do plasma (AZERÊDO, 1999; PUROHIT *et al.*, 1992; RITAR; SALAMON, 1982; TREJO *et al.*, 1987; TREJO *et al.*, 1992) ou relataram decréscimo na viabilidade seminal quando as células foram submetidas à centrifugação (TULI; HOLTZ, 1994). A criopreservação é um processo que impõe grandes desafios às células. Na velocidade de congelação considerada lenta, normalmente usada para criopreservação de sêmen, as células são seqüestradas em canais de solução não-

congelada entre os blocos de cristais de gelo, que crescem removendo água pura dos canais. Como consequência, a concentração de soluto nos canais aumenta e o volume de líquido é reduzido gradualmente. As células, expostas ao meio hiperosmótico, desidratam (MAZUR; COLE, 1989). Paralelamente, os espermatozóides que ficam atravessados entre os canais são expostos, simultaneamente, a concentrações diferentes de soluto (MERKT et al., 1971). Durante a descongelação, o processo é revertido, o meio extracelular está hiposmótico em relação ao intracelular, há um rápido afluxo de água e aumento de volume celular. Com o restabelecimento do equilíbrio osmótico, a célula retorna a seu volume normal (GAO et al., 1993; HOLT, 2000b; LEVIN; MILLER, 1981). Acima do limite máximo ou abaixo do limite mínimo tolerado de osmolalidade, há perda de integridade de membrana (MERYMAN, 1970).

Os danos causados por congelação lenta têm sido atribuídos, dentre outros fatores, ao aumento da concentração de sais dentro e fora da célula (McGANN, 1978), às deformações mecânicas à medida que os cristais de gelo se expandem e o diâmetro dos canais não-congelados diminui (MAZUR; COLE, 1989; MERKT et al., 1971; WATSON; DUNCAN, 1988), ao estresse mecânico da desidratação (WEITZE, 1977), ao processo de cristalização-recristalização do gelo (KOSHIMOTO; MAZUR, 2002a; MERKT et al., 1971), e à desestabilização de membranas e proteínas a baixo potencial de água (LEVIN; MILLER, 1981). O aumento na velocidade de congelação reduziria o tempo em que as células ficam expostas a estas condições desfavoráveis (WOELDERS et al., 1997). O estresse hipertônico induzido pela sacarose foi menor que o induzido pelo NaCl (GAO et al., 1993). A desidratação parcial dos espermatozóides, dentro dos limites de tolerância osmótica e previamente à

congelamento, poderia minimizar as flutuações de volume celular e viabilizar a congelamento rápida sem induzir gelo intracelular

No experimento 1, buscou-se simular, através da exposição do sêmen caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose, seguida de rediluição em meio isosmótico, o processo de desidratação e rehidratação pelo qual os espermatozoides passam durante a congelamento e descongelamento. A diluição em meio hiperosmótico foi muito melhor tolerada pelo espermatozoide caprino que o retorno à condição isosmótica proporcionado pela rediluição. A exposição a soluções hiperosmóticas de sacarose até o valor de 930 mOsm não causou perda de IM. Este valor é quase idêntico aos limites de tolerância osmótica descritos para ovinos: 910 mOsm (PERIS *et al.*, 2000) e 1000 mOsm (CURRY; WATSON, 1994; HOLT; NORTH, 1994). A tolerância às variações de volume ocasionadas pelas variações de osmolalidade do meio parece ter correlação com a maior ou menor sensibilidade de uma espécie ao processo de criopreservação. Como exemplo disto, espécies resistentes à congelamento seminal como o humano (GAO *et al.*, 1993, 1995) e o bovino (LIU; FOOTE, 1998) teriam valores de tolerância a soluções hiperosmóticas de 2.500 mOsm e 1.200 mOsm, respectivamente. O suíno, o eqüino e o canino, espécies cujos espermatozoides são sensíveis à congelamento, apresentariam valores de tolerância de 450, 587 e 500 mOsm, respectivamente (CAIZA de la CUEVA *et al.*, 1997b; FRASER *et al.*, 2001; SONGSASEN *et al.*, 2002).

No presente estudo, o percentual de células exibindo lesão de membrana após a rediluição foi proporcional ao grau de desidratação experimentado previamente. A rediluição abrupta, após exposição à solução de sacarose de 2.050 mOsm, reduziu para 21% a IM.



Em hemácias, foi descrito o fenômeno da lise pós-hipertônica (FARRANT; WOOLGAR, 1970; MAZUR; COLE, 1989) em que o retorno à condição isosmótica, após a incubação em meio hipertônico, levaria à lise celular, proporcional ao grau de hipotonicidade relativa entre as duas soluções. O que leva a autora a supor que o fator que causa dano celular na rediluição após incubação em meio hipertônico é a hipotonicidade relativa experimentada pelos espermatozóides. Em todos os outros trabalhos que avaliaram a IM e/ou a motilidade espermática, antes e após a rediluição, o retorno à condição isosmótica sempre causou maior dano que a diluição em meio hipertônico (BALL; VO, 2001; CAIZA DE LA CUEVA et al., 1997a; GAO et al., 1993, 1995; HOLT; NORTH, 1994; MEDRANO et al., 2002; WILLOUGHBY et al., 1996). As possíveis causas para este fenômeno de lise pós-hipertônica, também descrito em hemácias, seriam: 1) a velocidade com que a água atravessa os poros da membrana durante a rediluição (CURRY; WATSON, 1994; MULDREW; McGANN, 1994), que dependeria da temperatura (GILMORE et al., 1995; 2000), dos outros solutos presentes no meio (AGCA et al., 2002; LIU et al., 1998; LIU; FOOTE, 1998), da diferença de osmolalidade entre o meio de diluição e o de rediluição e da espécie e tipo celular em questão (CURRY; WATSON, 1994; PHELPS et al., 1999). 2) a redução da superfície celular na fase de desidratação (HAMMERSTEDT et al., 1990; STEPONKUS; WIEST, 1979); 3) a entrada na célula de solutos normalmente não-permeantes durante o estresse hiperosmótico (MAZUR et al., 1972; SHIER, 1988). As proteínas que constituem os canais de passagem de água através da membrana celular, chamadas aquaporinas/aquagliceroporinas, regulam o movimento de água e álcoois alifáticos como o glicerol para dentro e fora da célula, permitindo ajuste mais rápido do volume celular (STROUD et al., 2003).

A IM foi escolhida como o parâmetro para definir viabilidade espermática no Experimento 1 e no Experimento 2 em lugar de motilidade, porque células imóveis podem ter membranas intactas e a proteção à integridade de membrana era o objetivo central destes experimentos. No Experimento 1, a motilidade foi mais fortemente afetada que a integridade de membrana pela exposição a soluções hiperosmóticas. A diluição do sêmen em solução hiperosmótica de sacarose a 490 mOsm reduziu a motilidade para 46% dos valores do grupo mantido em solução isosmótica. A rediluição após exposição a solução de 930 mOsm fez baixar a motilidade para quase zero. Não houve recuperação da motilidade após retorno à isosmolalidade. Desta forma, ao contrário do que foi observado em outros trabalhos, com espermatozoides de outras espécies como: eqüino em Ball e Vo, 2001; ovino em Curry e Watson, 1994; humano em Gao et al., 1995; camundongo em Willoughby et al., 1996 e bovino em Woelders et al., 1997; nas quais a rediluição proporcionou a recuperação parcial da motilidade. Outros autores obtiveram achados semelhantes aos relatados no presente estudo para sêmen de diversas espécies como: suínos em Fraser et al., 2001 e bovinos em Gilmore et al., 2002; enquanto em outras, a rediluição proporcionou recuperação parcial da motilidade. A habilidade em recuperar parcial ou totalmente a motilidade após retorno à condição isosmótica parece depender do grau de desidratação ao qual as células foram submetidas, ou seja, à diferença de osmolalidade, ou grau de hipotonicidade relativa, entre a solução de diluição e a de rediluição.

A redução no conteúdo de água da célula pode ser causa da inibição, parcialmente reversível, da motilidade durante a incubação em meio hipertônico. A perda de água dificultaria o deslizamento dos filamentos dos microtúbulos ou outros elementos estruturais da cauda. Como a motilidade não pode ser totalmente

restaurada após a rediluição, sugere-se que algum dano permanente ocorreu, seja pela condição hiperosmótica, seja pelo retorno à condição isotônica (GAO et al., 1993).

A motilidade foi mais afetada por soluções hipotônicas que hipertônicas no espermatozóide humano (GAO et al., 1995) e murino (WILLOUGHBY et al., 1996) e não houve recuperação da motilidade quando sêmen suíno foi exposto a soluções hipotônicas e, em seguida, rediluído em solução isosmótica (GILMORE et al., 1996). A partir destes dados, pode-se supor que o dano ocasionado pela exposição a soluções hipotônicas, sejam estas soluções realmente hipotônicas ou de hipotonicidade relativa, é a maior causa de lise celular e o dano é sempre irreversível.

Salamon e Maxwell (2000) citam que embora 40-60% dos espermatozóides ovinos mantenham-se móveis após a descongelação, apenas 20-30% permaneceriam biologicamente íntegros, ou seja, a motilidade seria mais bem preservada que a integridade morfológica, onde diferentes porções da célula mostrariam graus variados de sensibilidade à criopreservação. A arquitetura das mitocôndrias, por exemplo, seria danificada sem que isto se refletisse em alterações nos filamentos e fibrilas da cauda.

A membrana do espermatozóide seria mais resistente ao estresse osmótico que os elementos responsáveis pela motilidade. A perda irreversível de motilidade poderia ser causada pela redução na produção de ATP. As mitocôndrias se encontrariam mais danificadas do que é sugerido pela perda de IM. Em suínos, a incubação do sêmen em meio hiperosmótico afetou mais fortemente a motilidade que a IM (FRASER et al., 2001).

Em eqüinos, soluções de 600 mOsm não afetaram a IM, mas reduziram a motilidade a 0% (BALL; VO, 2001). Durante a exposição a soluções hiperosmóticas, não houve perda de potencial elétrico da membrana das mitocôndrias. A perda só foi constatada após a rediluição e foi proporcional à osmolalidade prévia.

Em sêmen murino, a atividade das mitocôndrias avaliada com Rhodamina 123, foi similar a IM, permanecendo quase inalterada nas soluções hiperosmóticas e caindo marcadamente após rediluição abrupta em meio isotônico. O dano pós-rediluição, tanto da membrana plasmática quanto das mitocôndrias, foi proporcional ao grau de desidratação prévia (WILLOUGHBY et al., 1996).

Em testes de fertilidade in vivo de sêmen ovino criopreservado, a inibição da função mitocondrial reduziu a fertilidade quando a IA foi feita por via transcervical, mas não influenciou quando esta foi por via laparoscópica. A atividade respiratória das mitocôndrias teria um papel fundamental na migração dos espermatozóides pela cérvix. A perda de atividade mitocondrial causada pela criopreservação estaria envolvida na baixa fertilidade do sêmen ovino após IA por via transcervical (WINDSOR, 1997).

De forma similar ao que ocorre na diluição em soluções hiperosmóticas seguida de rediluição, a perda de integridade de membrana durante a congelação e descongelação de espermatozóides suínos, acompanhada com auxílio de criomicroscópio, ocorreu apenas durante o aquecimento. A IM foi mantida durante o resfriamento e a congelação (MEDRANO et al., 2002).

## 6.2 EXPERIMENTO 2

No Experimento 2 do presente estudo, os danos à IM se estabeleceram com 1 min de exposição à solução hiperosmótica, não se agravaram após 10 min de incubação a 38°C e foram proporcionais ao grau de desidratação a que as células haviam sido submetidas.

Em um estudo com sêmen humano, o dano à IM aumentou progressivamente em soluções hipertônicas até o tempo de 30 s. Após este período, a exposição continuada por até 5 min não agravou os danos (GAO et al., 1993). Em trabalho posterior destes autores, foi observado que o efeito do tempo de incubação sobre a IM se tornou visível quando o período de incubação foi estendido para 30 min (GAO et al., 1995). Em suínos, a IM foi pouco influenciada por incubação em solução hiperosmótica por até 5 min (CAIZA de la CUEVA et al., 1997b).

## 6.3 EXPERIMENTO 3

Gao et al. (1995) justificam o uso da motilidade como avaliação da viabilidade espermática por esta ser mais sensível que a IM ao efeito do estresse osmótico. Assim, ao considerar que o Experimento 3 seria o primeiro a estudar os efeitos dos diluentes hiperosmóticos sob condições de resfriamento e congelação, optou-se por considerar a motilidade no tempo zero pós-descongelação como parâmetro principal de viabilidade espermática.

A exposição, por curto período de tempo, de sêmen canino a meio de transporte contendo leite, conferiu maior tolerância ao estresse hiperosmótico em solução de NaCl, que a exposição a meio Tris-gema (SONGSASEN et al., 2002).

A presença da gema de ovo, entretanto, não altera a permeabilidade da membrana de espermatozoides murinos à água (DEVIREDDY et al., 1999).

Em sêmen bovino, diluído em soluções concentradas de sacarose, a composição do diluente influenciou na faixa de tolerância osmótica. Diluídas em Tris-gema, as células toleraram uma faixa mais ampla de variação da osmolalidade que em diluente de leite desnatado (LIU et al., 1998). Esta maior tolerância ao meio hipertônico parece ser conferida pela presença da gema no diluidor (LIU; FOOTE, 1998; AGCA et al., 2002). A ampliação da faixa de tolerância osmótica dos espermatozoides reduziria os danos associados com as flutuações de volume e melhoraria a sobrevivência pós-congelação.

A composição do meio diluidor pode interferir na permeabilidade da membrana celular e na sua habilidade de ajustar-se às variações de osmolalidade durante a congelação. Ao utilizar o diluidor comercial para sêmen bovino AndroMed, buscou-se, através dos lipídios de soja presentes neste diluidor, ampliar a faixa de tolerância osmótica dos espermatozoides caprinos. Foi considerada a hipótese de que a exposição a baixas temperaturas e a presença do glicerol, durante o resfriamento e a congelação, provocariam um grau ainda maior de desidratação celular, além de alterarem as características de permeabilidade das membranas. A soma dos fatores baixa temperatura presença de glicerol provavelmente exigiria que fosse ajustada a quantidade de sacarose para não ultrapassar o limite tolerado pelas células.

Tomando-se por base os resultados do Experimento 1, no qual a rediluição abrupta causou extenso dano, buscou-se também no Experimento 3 minimizar as flutuações do volume celular, utilizando, após a descongelação, rediluição progressiva à temperatura de 4°C. Os resultados obtidos neste experimento mostraram que a congelação no diluidor AndroMed adicionado de 375 mM de sacarose, seguida de descongelação a 4°C e rediluição progressiva também a 4°C, permitiu alcançar motilidade pós-descongelação similar à do grupo controle.

#### 6.4 EXPERIMENTO 4

No experimento 4, a exposição pré-congelação à concentração de 375 mM de sacarose em meio TRIS-gema, pelo menor espaço de tempo (2 min), foi favorável à preservação da motilidade e IM. A descongelação e rediluição a 4°C por sua vez, quando comparada com a realizada a 38°C, beneficiou motilidade e vigor. De maneira inversa, a IM foi favorecida pela descongelação e rediluição a 38°C. No espermatozóide humano (GAO et al., 1993) e eqüino (Caiza de la Cueva et al., 1997a), a temperatura e tempo nos quais uma célula permanece em estado desidratado, influem no grau de dano hipertônico. Sêmen suíno exposto a soluções hiperosmóticas de NaCl, glicerol ou glicose a 4, 16 ou 37°C, apresentou danos de IM apenas em soluções acima de 1000 mOsm e a 37°C. O efeito da temperatura de incubação pode ser conseqüência da diferença no grau de fluidez da membrana nas diferentes temperaturas, que modulariam a capacidade do espermatozóide de regular sua osmolalidade e volume (CAIZA de la CUEVA et al., 1997b). Sêmen

eqüino, incubado em meio hiperosmótico e rediluído em solução isosmótica, perdeu menos IM quando a incubação e rediluição foram a 4°C que a 16 ou a 37°C (CAIZA de la CUEVA et al., 1997a).

Na temperatura de 0°C, o espermatozóide humano tolerou um maior grau de desidratação por solutos não-permeantes que a 22°C. O dano da rediluição também foi reduzido. Quando a incubação foi em meio hipertônico com glicerol, a redução da temperatura de rediluição agravou o dano à IM. Os autores atribuíram este fato à diferença de energia de ativação da membrana para glicerol e água. No caso do glicerol esta é cinco vezes maior que para água. Assim, em condições de baixa temperatura do meio, a permeabilidade da membrana ao glicerol seria reduzida mais fortemente que a permeabilidade à água (GAO et al., 1993). Liu e Foote (1998) constataram que a 5°C a motilidade foi menos afetada pela exposição a soluções hiperosmóticas que a 25°C.

O espermatozóide é uma célula complexa e o sucesso na criopreservação depende de solucionar uma intrincada equação de fatores para evitar danos às diferentes porções da célula. Além disso, a membrana não é homogênea; há assimetria de fosfolipídios entre regiões e entre as camadas interna e externa da bicamada, o que pressupõe temperaturas de transição de fase diferentes e exigências diferentes para melhor criopreservação (HAMMERSTEDT et al., 1990). Mitocôndrias e membrana plasmática de espermatozoides de peixes, por exemplo, mostraram requisitos diferentes em relação ao crioprotetor ideal. O DMSO foi favorável à IM e tóxico para as mitocôndrias, a glicina ao contrário, permitiu preservação das mitocôndrias e do conteúdo de ATP, mas não conferiu proteção à membrana plasmática (SHUYANG HE; WOODS III, 2004). Em ovinos (WINDSOR, 1997), foi demonstrado que o glicerol não confere crioproteção alguma às mitocôndrias.



## 6.5 EXPERIMENTO 5

No Experimento 5, as conclusões oriundas dos experimentos anteriores foram usadas para elaborar a hipótese de que, em presença de altas concentrações de sacarose, haveria menor necessidade de crioprotetores permeantes como o glicerol, ou eventualmente que, sob as condições de intensa desidratação produzidas pelo diluente hiperosmótico, a citotoxicidade do glicerol seria exacerbada. Esta hipótese foi confirmada pelos resultados deste experimento, no qual a redução do nível de glicerol para 1,7%, no diluente contendo 375 mM de sacarose, resultou em viabilidade espermática superior à do diluente padrão TRIS-gema, com 6,8% de glicerol. Esta vantagem foi ainda maior em relação ao diluente com 6,8% de glicerol adicionado de 375 mM de sacarose.

A partir deste experimento, passou-se a utilizar o parâmetro de motilidade e vigor após 6 h de incubação a 38°C como parâmetro principal na seleção do melhor protocolo de criopreservação. O movimento progressivo é uma importante função que permite ao espermatozóide alcançar o local de fertilização (revisado em VISHWANATH; SHANNON, 1997). Como foi demonstrado em outros trabalhos (AISEN et al, 2000; CHENG et al., 2004; CORREA; ZAVOS, 1995; DEKA; RAO, 1987) a motilidade logo após a descongelação nem sempre reflete diferenças entre os diluentes. Estas diferenças são detectadas após algumas horas de incubação a 37°C, temperatura similar à do corpo da fêmea. A incubação do sêmen pós-descongelação simula, de certa forma, o que ocorre após a inseminação artificial.

Farshad (1994) obteve os melhores resultados de viabilidade, com sêmen caprino congelado em meio hipertônico TRIS-gema com 220 mM de sacarose,

quando reduziu o glicerol de 6,8 para 5%. A adição dos crioprotetores foi feita 30 min antes da congelação e a descongelação foi realizada a 50°C.

Os melhores resultados de motilidade com sêmen de camundongo congelado foram obtidos em meio diluidor com 6% de rafinose, 15% de gema e apenas 1% de glicerol. A concentração de 4% de glicerol foi tóxica para as células (DEVIREDDY et al., 1999). Sêmen fresco de carneiro, incubado em meio contendo glicerol, mostrou rápida penetração em oócitos zona-free de hamster. Este efeito foi proporcional à concentração de glicerol do meio. O glicerol parece ter induzido e sincronizado a reação acrossômica e também encurtado a vida útil dos espermatozóides (16 h no controle vs 10 h no tratado). A baixa concepção associada a IA com sêmen criopreservado poderia ser causada pela capacitação precoce dos espermatozóides, que ocorreria antes destes alcançarem o oócito para fertilização (SLAVIK, 1987). Em ovinos (HOLT, 2000b; WATSON, 2000) e caprinos (RITAR; BALL, 1992), a IA laparoscópica proporcionou melhor fertilidade que a intracervical. Em outra pesquisa com sêmen ovino, foi observado o mesmo fenômeno de antecipação da capacitação espermática. A criopreservação encurtou o período em que os espermatozóides estiveram aptos a fertilizar in vitro onde, no tempo zero de incubação, o sêmen descongelado resultou em 74% de oócitos fertilizados enquanto o sêmen fresco alcançou apenas 20%. Após 24 h de incubação, o sêmen fresco resultou em 45% e o descongelado obteve apenas 6% de fertilização (GARDE et al., 1993). Em suínos (HOLT, 2000a), maior sobrevivência in vitro do espermatozóide, sob condições capacitantes, esteve correlacionada com maior taxa de concepção e maior tamanho da ninhada. Os danos causados pela criopreservação parecem não se restringir à capacidade fertilizante do espermatozóide. Em ovinos, a inseminação com sêmen

congelado esteve associada com maior incidência de mortalidade embrionária precoce (SALAMON; MAXWELL, 2000).

Crioprotetores permeantes, como o glicerol e o etilenoglicol estimularam a fusão de membranas de espermatozóides murinos. Espermatozóides fusionados entre si, pela cabeça ou pela cauda, foram achados freqüentes nas condições do mesmo experimento. Crioprotetores não-permeantes como os açúcares sacarose e rafinose, nas concentrações de 12% 18%, respectivamente, causaram menos de 3% de dano (AGCA et al., 2002).

## 6.6 EXPERIMENTO 6

Noiles et al. (1997) propõem que a grande sensibilidade do sêmen murino à congelação se deve à incapacidade da célula de responder ao estresse osmótico durante os processos de congelação e descongelação, devido ao rápido declínio da permeabilidade da membrana à água a baixas temperaturas.

Além das citadas ações citotóxicas, o glicerol, e outros crioprotetores permeantes como o etilenoglicol, reduzem a permeabilidade da membrana celular à água, especialmente a baixas temperaturas, reduzindo ainda mais a velocidade de resposta da célula às variações osmóticas do meio (AGCA et al., 2002; CHAVEIRO et al., 2004; DEVIREDDY et al., 1999, 2002; PHELPS et al., 1999). A permeabilidade da membrana do espermatozóide humano ao glicerol é oito vezes maior a 20°C que a 0°C e, quanto maior a concentração de glicerol no meio, menor a permeabilidade da membrana a este soluto (DU et al., 1994). Haveria bloqueio, via modificação da

bicamada lipídica, dos canais primários e secundários de passagem de água, o que reduziria a velocidade de passagem da água aos valores típicos da difusão da água pela bicamada lipídica. O grau de redução da permeabilidade da membrana seria característico de cada crioprotetor permeante e para cada tipo celular (GILMORE et al., 1995).

No Experimento 6, concebido como um complemento ao Experimento 5, buscou-se avaliar os efeitos combinados da menor concentração de glicerol e de diferentes velocidades de descongelação sobre os parâmetros espermáticos. Foi observado que, no momento inicial pós-descongelação, não havia diferença entre rediluir em três ou em cinco passos a 4°C. A superioridade da rediluição em cinco passos se estabeleceu à medida que avançou o tempo de incubação pós-descongelação. A baixa temperatura de descongelação utilizada (4°C), ao baixar a permeabilidade da membrana à água e ao glicerol, pode ter contribuído para reduzir o efeito da velocidade de descongelação de forma que, a diferença entre os tratamentos, no momento inicial pós-descongelação, foi minimizada.

Gao et al. (1995) e Gilmore et al. (1997) mostraram que a adição e a rediluição serial de crioprotetores foi benéfica para minimizar o estresse osmótico sobre as células espermáticas. Tuli e Holtz (1994) observaram, em sêmen de caprinos, que a adição progressiva do glicerol, em quatro passos a 37°C, foi mais favorável à motilidade e IM pós-descongelação que a adição em passo único. O intervalo ideal entre os passos de adição/remoção de um crioprotetor permeante seria condicionado pela permeabilidade da célula ao soluto, proporção superfície/volume celular, quantidade de crioprotetor a ser adicionado ou retirado e tolerância da célula à hipotonicidade/hipertonicidade. O tempo ideal de adição de um soluto é em geral menor que o tempo necessário para sua remoção (LEVIN; MILLER, 1981). Para sêmen de camundongo, o diluente de

congelamento com 7,5% de trealose 6% de glicerol proporcionou boa fertilidade in vitro. A adição e rediluição do diluente em oito passos não diferiu de 16 passos (STOREY et al., 1998). Agca et al. (2002), Phelps et al. (1999) e Willoughby et al. (1996) observaram que ha diferença entre linhagens de camundongos na permeabilidade da membrana o água e aos crioprotetores permeantes, o que resultou em diferença no número de passos necessários para adição e remoção do crioprotetor.

Curry e Watson (1994) relataram que a redução progressiva da osmolalidade do meio (em passos de 25 mOsm com intervalos de 2 min) abaixou o valor de osmolalidade que causava lise hipotnica de sêmen ovino. Isto sugere que haveriam células no ejaculado que seriam sensíveis  velocidade com que a água atravessa a membrana.

## 6.7 EXPERIMENTO 7

No Experimento 7, buscou-se estudar melhor a influência, sobre os parâmetros espermáticos pós-descongelamento, da temperatura e da velocidade de rediluição e da possível interao entre estes fatores. Além destes, foram ainda avaliados os efeitos da concentração de glicerol e de sacarose. Dentre os tratamentos, a combinação de 300 mM de sacarose com 3,4% de glicerol e descongelamento e rediluição em cinco passos RBV-5 a 20C resultou na maior motilidade após incubação por 6 h a 38C. Ao avaliar em separado os efeitos dos diversos fatores supracitados, foram encontradas interessantes interaoes. A IM, por exemplo, foi influenciada pela interao entre velocidade de rediluição e concentração de glicerol. Para alcançar os melhores resultados, quanto menor a

concentração de glicerol do diluente, mais rápida teve de ser a rediluição, em contra partida, uma rediluição mais lenta favoreceu as amostras congeladas com maior concentração glicerol. Na literatura, é relatado de forma similar que quanto maior a concentração do crioprotetor permeante, maior o número de passos necessários para a rediluição (GAO et al., 1995; LEVI; MILLER, 1981).

Avaliando apenas o efeito da velocidade de rediluição foi encontrado que a rediluição mais rápida, em dois passos, foi favorável a motilidade e vigor espermáticos.

A concentração de sacarose influenciou fortemente a IM e a motilidade em todos os tempos avaliados. Ao contrário do que se poderia esperar, não houve interação entre concentração de sacarose e velocidade de descongelação. Isto pode ter se originado na concentração moderada de sacarose utilizada que, mesmo em rediluições mais lentas, em que as células ficam expostas a altas concentrações de sacarose por mais tempo, a concentração de sacarose presente não seria alta o suficiente para causar danos. Além disto, a diferença no tempo total de rediluição entre o protocolo mais rápido (R-3) e o mais lento (RBV-5) pode não ter sido suficiente para originar diferença significativa entre os tratamentos.

Houve efeito da temperatura na faixa de concentração de sacarose estudada onde, a descongelação e rediluição a 20°C foram mais favoráveis aos parâmetros de viabilidade espermática que a descongelação e rediluição a 4°C.

Na literatura encontra-se que no espermatozóide murino, a tolerância osmótica foi prejudicada quando a temperatura foi reduzida para 0°C. Nesta temperatura, a membrana, menos flexível, rompeu quando a osmolalidade foi de 130 mOsm, enquanto que entre 4 e 37°C, a osmolalidade de 27 mOsm foi tolerada

(NOILES et al., 1997). Foi demonstrado que, quanto mais baixa a temperatura, mais baixa a permeabilidade da membrana celular à água (GILMORE et al., 2000).

## 6.8 EXPERIMENTO 8

A adição e remoção rápidas de 1 M de etilenoglicol foi menos prejudicial à IM (BALL; VO, 2001) e à motilidade espermática (GUTHRIE et al., 2002) que a mesma concentração de glicerol. Em algumas espécies, a permeabilidade da membrana do espermatozóide ao EG é até mais de três vezes maior que ao glicerol (GILMORE et al. 1995, 2000). Nestes estudos, os autores referem que o glicerol, mais que o etilenoglicol, reduz a permeabilidade da membrana à água. Isto implicaria que menos passos seriam necessários para adição e remoção do etilenoglicol. Outros autores, entretanto, referem para a membrana de espermatozóide bovino valores menores de permeabilidade ao EG que ao glicerol (CHAVEIRO et al., 2004). Dentre os crioprotetores usados na congelação de sêmen, o etilenoglicol mostrou a maior velocidade de penetração na membrana do espermatozóide humano, a menor interferência na permeabilidade da membrana à água e foi o que menos perdeu permeabilidade a baixas temperaturas (GILMORE et al., 2000).

Sêmen ovino congelado em diluente com etilenoglicol ou em diluente com glicerol não mostrou diferença entre os crioprotetores, após 5 h de teste de termorresistência, na motilidade, vigor e integridade de acrossoma, mas a membrana plasmática, o núcleo e as mitocôndrias foram mais bem preservados no diluente com etilenoglicol (BRISOLA et al., 1999). O crioprotetor permeante ideal

seria aquele ao qual a célula fosse mais permeável, resultando em menores flutuações de volume durante sua adição e remoção. O etilenoglicol confirmou sua superioridade sobre o glicerol na preservação da viabilidade do espermatozóide humano após criopreservação. A adição dos crioprotetores foi sempre menos danosa que sua remoção. A rediluição abrupta foi desfavorável à motilidade dos espermatozóides e o dano foi maior na presença de glicerol do que quando etilenoglicol foi o crioprotetor utilizado (55 vs 92% da motilidade prévia, respectivamente (GILMORE et al., 1997).

Baseando-se nestes trabalhos, buscou-se no Experimento 8 testar a hipótese de que a congelação em meio contendo etilenoglicol, como descrito em espermatozóides de outras espécies, permitiria uma rediluição mais rápida que o glicerol.

Os resultados não confirmaram a hipótese. Nas temperaturas testadas de 20 e 38°C, não houve vantagem no uso do etilenoglicol como crioprotetor associado à sacarose. Estes resultados poderiam refletir diferenças entre as espécies na permeabilidade da membrana espermática aos diferentes crioprotetores permeantes ou o fato de que talvez a diferença de efeito entre as temperaturas avaliadas não ter sido suficiente para resultar em diferenças significativas nos resultados.



## 6.9 EXPERIMENTO 9

No Experimento 9, o objetivo foi testar se as características de agente crioprotetor creditadas à trealose poderiam se confirmar em um diluente livre de crioprotetores permeantes. Os resultados confirmaram as qualidades da trealose na preservação da IM e motilidade espermática. A longevidade dos espermatozoides durante a incubação a 38°C foi especialmente favorecida pelo diluente com 300 mM de trealose se comparada à obtida no diluente controle TRIS-gema-glicerol (56% vs 26%, respectivamente). Não houve diferença estatística entre o diluente contendo 300 mM de trealose e o diluente contendo 300 mM de sacarose, mas a trealose apresentou melhores resultados em todos os parâmetros.

Na literatura, encontram-se vários trabalhos que destacaram as qualidades diferenciadas da trealose como agente crioprotetor. A temperatura de formação de fase vítrea é muito mais alta para a trealose que para a sacarose (CROWE et al., 2001), além disso, a trealose tem menor tendência a cristalizar e precipitar, o que a mantém participando osmoticamente da solução mesmo a baixos níveis de atividade de água (WOLFE; BRIANT, 1999). Assim, é possível propor a hipótese de que, durante a congelação, o diluente contendo trealose iria passar para a fase vítrea a uma temperatura mais alta que um diluente adicionado de sacarose. A vitrificação permitiria manter as membranas em fase líquido-cristalina e, ao aprisionar os sais dissolvidos em uma fase amorfa e inerte, impediria ou retardaria fortemente a desidratação.

Para cada grama de trealose em solução, 0,35 g de água permaneceriam em estado coligado como um xarope vítreo e impedidas de congelar. Soluções aquosas de NaCl e 3,5% de trealose formaram vidro em temperaturas abaixo de 0°C e a ausência de transição eutética indica que todo o NaCl foi englobado nesta fase vítrea (NICOLAJSEN; HVIDT, 1994).

Os açúcares, sob determinadas condições, poderiam penetrar nas células durante a criopreservação, o que poderia contribuir para o efeito de crioproteção. Shier (1988), ao congelar fibroblastos murinos, observou que a sacarose, marcada com radioisótopo, efetivamente penetrava as células durante o processo de congelação/descongelação, o que normalmente não ocorreria em condições de incubação a 37°C. Fibroblastos humanos que haviam recebido o gene para síntese de trealose, mantiveram a viabilidade até cinco dias depois de serem dessecados (GUO et al., 2000). Fibroblastos e queratinócitos sobreviveram à congelação após terem recebido trealose intracelular, via poros na membrana plasmática. A concentração de 200 mM de trealose intracelular garantiu 80% de viabilidade (EROGLU et al., 2000).

Bactérias dessecadas em meio contendo sacarose ou trealose mantiveram a mesma temperatura de transição de fase da membrana de bactérias totalmente hidratadas (LESLIE et al., 1995). Na presença de trealose, lipídios desidratados mostraram a mesma temperatura de transição de fase de lipídios totalmente hidratados, demonstrando que a trealose substitui a água de hidratação (CROWE et al., 1998).

An et al. (2000) obtiveram melhores resultados de congelação de espermatozóide murino em soluções aquosas de trealose ou rafinose sem adição de glicerol. Diluentes sem glicerol e contendo os açúcares trealose e rafinose

proporcionaram os melhores resultados de sobrevivência e de fertilidade *in vitro* de espermatozoides murinos (SZTEIN et al., 2001). Sêmen ovino congelado em meio sem glicerol e composto de 30% de gema e maltose resultou em 60% de motilidade (ABDELHAKEM et al., 1991). Sêmen murino mostrou melhores resultados de congelação em meio de rafinose (400 mOsm) sem glicerol. O glicerol além de não ser efetivo, interferiu com a ação crioprotetora da rafinose (KOSHIMOTO; MAZUR, 2002b). Em sêmen caprino, a adição de trealose aumentou a fluidez da membrana após congelação e foi superior ao efeito da adição de sacarose ou de TRIS. Os melhores resultados pós-descongelação foram obtidos com meio isotônico contendo 225 mM de trealose e 20% de gema de ovo (ABOALA; TERADA, 2003). Em trabalho posterior dos mesmos autores (ABOAGLA; TERADA, 2004), a sobrevivência de espermatozoides caprinos foi favorecida pela congelação em meio contendo 370 mM de trealose e 4% de glicerol, adicionado de sódio-dodecil-sulfato, seguida de rediluição em meio isotônico.

Aisen et al. (2002) obtiveram uma fertilidade pós-inseminação cervical em ovinos com sêmen congelado, 2,5 vezes maior quando o sêmen foi congelado em meio hipertônico contendo 3% de glicerol e 100 mM de trealose comparado com meio Tris-gema tradicional. Liu et al. (1998), reduziram o glicerol do diluente de sêmen bovino de 0,97 M para 0,41 M e observaram que houve tendência a melhor motilidade nos diluentes contendo 75 mM de sacarose ou trealose. O açúcar sozinho, entretanto, não garantiu crioproteção aos espermatozoides.

<sup>1</sup>Lampeter (2004) (informação verbal) relatou que a IM de sêmen bovino congelado em meio Tris-gema hipertônico com 400 mM de trealose e 7% de glicerol foi 10% melhor que no diluente padrão Tris-gema-glicerol. A motilidade pós-

descongelamento no diluente com trealose era 0% mas podia ser parcialmente recuperada após rediluição em meio isotônico. Os resultados de fertilidade (expressos em taxa de não-retorno ao cio aos 56 dias) de 4.778 inseminações feitas com sêmen congelado neste diluente e inseminado sem rediluição pós-descongelamento, entretanto, foram em média 8,2% inferiores ao do sêmen congelado em meio Tris-gema padrão.

Na opinião da autora, uma possível justificativa para estes resultados desfavoráveis do diluente de trealose na fertilidade pós IA seria a ocorrência de choque hiposmótico quando da introdução do sêmen no genital da fêmea. Além disso, no supracitado experimento com sêmen bovino, o percentual de glicerol utilizado não foi reduzido como no Experimento 9 do presente trabalho, o que pode ter contribuído para exacerbar a desidratação na congelamento e o posterior choque hiposmótico na IA.

Quando células congeladas em meio contendo glicerol são transferidas abruptamente para um meio isotônico sem glicerol (como o genital da fêmea), o meio intracelular está hiperosmótico em relação ao extracelular. Devido ao fato da permeabilidade da membrana à água ser maior que ao glicerol, há entrada de água e aumento do volume celular. Se o limite de tolerância da membrana é ultrapassado, ocorre a morte celular (BALL; VO, 2001). A lise causada pela remoção de glicerol de espermatozóide humano dependeu da velocidade de rediluição. Nove passos de rediluição permitiram preservar a IM, enquanto rediluição em passo único foi altamente destrutiva (GAO et al., 1993).

---

<sup>1</sup> Informação pessoal - Dr. W. W. Lampeter em Goettingen, Alemanha, em julho de 2004.

Correa e Zavos (1995) também constataram dano celular quando sêmen bovino, congelado em diluente contendo 7% de glicerol, foi rediluído abruptamente em meio isotônico após a descongelação. Ao compararem rediluição abrupta e rediluição lenta por gotejamento, não encontraram diferença na motilidade feita entre as velocidades de rediluição no tempo zero, mas a superioridade da rediluição lenta se tornou aparente à medida que aumentou o tempo de incubação a 37°C. Fiser e Fairfull (1989) não encontraram diferença na motilidade de sêmen ovino congelado em diluente contendo 4% de glicerol e rediluído em um passo único ou de forma progressiva. Estes autores, entretanto, avaliaram a motilidade apenas no momento pós-descongelação e foi demonstrado por outros trabalhos (AISEN et al., 2000; CHENG et al., 2004; CORREA; ZAVOS, 1995; DEKA; RAO, 1987) que a avaliação após algumas horas de incubação pode ser essencial para detectar diferenças entre os métodos.

A complexidade estrutural do espermatozóide pode ser um fator complicador do sucesso da criopreservação, pois é improvável que qualquer descrição isolada de permeabilidade de membrana ou energia de ativação possa ser aplicada à célula inteira (HOLT, 2000a).

A injúria causada pela criopreservação não pode ser explicada por um único mecanismo solitário. A seqüência de eventos físico-químicos pelos quais os espermatozoides passam durante os processos de adição do crioprotetor, resfriamento, congelação, descongelação e, posteriormente, migração pelo genital da fêmea até o sítio de fertilização dão margem a que fatores deletérios possam agir em cada uma das fases citadas e em cada porção da complexa célula que é o espermatozóide. A máxima recuperação da viabilidade celular após criopreservação requer que se conheçam melhor os elementos da fisiologia espermática,

considerando sempre que existem diferenças inter e intraespecíficas que não podem ser subestimadas.

Pelo conhecimento da autora, esta é a primeira descrição na literatura dos valores de tolerância do espermatozóide caprino a soluções hiperosmóticas de sacarose e do uso desta informação na elaboração de diluentes e protocolos de congelação para sêmen caprino.

## 7 CONCLUSÕES

- O espermatozóide caprino tolera soluções hiperosmóticas de sacarose até o limite de 930 mOsm e a incubação por tempo de até 10 minutos não agrava os danos à integridade da membrana

- Os danos após o retorno à condição isosmótica são maiores que os ocorridos durante a exposição a soluções hiperosmóticas e a perda de viabilidade é proporcional ao grau de desidratação prévia

- Nas condições deste experimento, etilenoglicol e glicerol não diferiram em sua ação crioprotetora

- A desidratação parcial causada por soluções concentradas de sacarose ou trealose permite a congelação de sêmen sem adição de crioprotetores permeantes

- Os melhores resultados pós-descongelação são obtidos congelando sêmen caprino em diluidor TRIS-gema sem glicerol adicionado de 300 mM de trealose

## REFERÊNCIAS

ABDELHAKEM, A. A.; GRAHAM, E. F.; VAZQUEZ, I. A.; CHALONER, K.M. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. **Cryobiology**, v. 28, p. 43-49, 1991.

ABOAGLA, E. M.-E.; TERADA, A. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, n. 5, p. 809-818, 2004.

AGCA, Y.; GILMORE, J.; BYERS, M.; WOODS, E. J.; LIU, J.; CRITSER, J. K. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. **Biol. Reprod.**, v. 67, n. 5, p. 1493-1501, 2002.

AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO, A.; GARDE, J.J. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, v. 53, p. 1053-1061, 2000.

AISEN, E. G.; MEDINA, V. H.; VENTURINO, A. Evaluacion del semen ovino congelado en distintas concentraciones de trealosa. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 1, p. 282-283, 1999.

ALMLID, T.; JOHNSON, L. A. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. **J. Anim. Sci.**, v. 66, n. 11, p. 2899-2905, 1988.

AN, T.Z.; IWAKIRI, M.; EDASHIGE, K. et al. Factors affecting the survival of frozen-thawed mouse spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, n. 3, p. 237-249, 2000.

ANDRADE, J.S. **Sêmen caprino congelado: efeito de dois diluentes sobre a taxa de fertilidade**. Belo Horizonte: UFMG. Escola Veterinária, 1996. 53p. Dissertação Mestrado.

ANUALPEC – **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: Argos Comunicações, 1999. p. 360.



AZERÊDO, G. A. de. **Uso de sondas fluorescentes na avaliação de membranas plasmáticas de espermatozoides de caprinos (*Capra hircus* L.), submetidos à congelamento na presença e ausência de plasma seminal.** Jaboticabal: FCAV-UNESP, 1999. 72p. Dissertação (Mestrado).

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. **J. Androl.**, v. 22, n. 6, p. 1061-1069, 2001.

BECKER-SILVA, S. C. **Caracterização histológica e seminal do desenvolvimento sexual de caprinos Saanen, criados em sistema intensivo.** Belo Horizonte: Escola Veterinária da UFMG, 2000. 117p. Dissertação (Mestrado).

BILLI, D.; WRIGHT, D. J.; HELM, R. F. et al. Engineering desiccation tolerance in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 4, p. 1680-1684, 2000.

BLESBOIS, E.; LESSIRE, M; HERMIER, D. Effect of cryopreservation and diet on lipids of fowl sperm and fertility. **Poult. Avian Biol. Rev.**, v.8, n.3-4, p.149-154, 1997.

BOTHA, P. N. Boer goat: potential for meat production. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 1., 2000, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA-PB, 2000. p. 251-260.

BUHR, M.M.; CURTIS, E. F.; SOMNAPAN KAKUDA, N. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v. 31, p. 224-238, 1994.

CAIZA de la CUEVA, F.I.; PUJOL, M. R.; RIGAU, T.; BONET, S.; MIRÓ, J.; BRIZ, M.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Resistance to osmotic stress of horse spermatozoa: the role of ionic pumps and their relationship to cryopreservation success. **Theriogenology**, v. 48, p. 947-968, 1997a.

CAIZA de la CUEVA, F. I.; RIGAU, T.; PUJOL, R; PIEDRAFITA, J.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. **Anim. Reprod. Sci.**, v.48, p. 301-315, 1997b.

- CEROLINI, S.; KELSO, K. A.; NOBLE, R. C. et al. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 976-980, 1997.
- CHANDLER, J. E.; PAINTER, C. L.; ADKISON, R. W. et al. Semen quality characteristics of dairy goats. **J. Dairy Sci.**, v. 71, n. 6, p. 1638-1646, 1988.
- CHEN, T.; ACKER, J.P. ; EROGLU, A. et al. Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells. **Cryobiology**, v.43, n. 1, p. 168-181, 2001.
- CHENG, F.-P.; WU, J.-T.; CHAN, J. P.-W.; WANG, J. S.; FUNG, H. P.; COLENBRANDER, B.; TUNG, K. C. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. **Theriogenology**, v.61, p. 1605-1616, 2004.
- CHESHMEDJIEVA, S. B.; VAISBERG, Ch. N. Effect of cold shock on phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine of buffalo spermatozoa plasma membranes. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 4, São Paulo, 1994. **Proceedings...** São Paulo: Fundação FMVZ-USP, 1994. p. 516-518.
- COLLIN, S.; BAILEY, J. L. Assessment of intracellular calcium levels in cryopreserved bovine sperm by flow cytometry. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 341, 1999.
- COOPER, T.G.; CHING-HEI YEUNG. Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, p. 28-38, 2003.
- CORMIER, N.; SIRARD, M. A.; BAILEY, J. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **J. Androl.**, v.18, n.4, p. 461-468, 1997.
- CORREA, J. R.; ZAVOS, P.M. Frozen-thawed bovine spermatozoa diluted by slow or rapid dilution method: measurements on occurrence of osmotic shock and sperm viability. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 963-971, 1995.

CORTEEL, J. M. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v. 14, p. 741-745, 1974.

CORTEEL, J. M. Effet du lavage sur la conservation des spermatozoïdes de bouc a basse température. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v. 15, p. 525-528, 1975a.

CORTEEL, J. M. The use of progestagens to control the oestrous cycle of the dairy goat. **Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.**, v. 15, n. 2, p. 353-363, 1975b.

CROWE, J. H.; CARPENTER, J. F.; CROWE, L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 60, p. 73-103, 1998.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; OLIVER, A. E.; TSVETKOVA, N. ; WOLKERS, W.; TABLIN, F. The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stabilization of Cells in the Dry State. **Cryobiology**, v. 43, n. 2, p. 89-105, 2001.

CROWE, J. H.; HOEKSTRA, F. A.; CROWE, L. M.; ANCHORDOGUY, T. J.; DROBNIS, E. Lipid phase transitions measured in intact cells with fourier transform infrared spectroscopy. **Cryobiology**, v. 26, n. 1, p. 76-84, 1989.

CROWE, J. H.; TABLIN, F.; TSVETKOVA, N. et al. Are lipid phase transitions responsible for chilling damage in human platelets? **Cryobiology**, v. 38, p. 180-191, 1999.

CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. **Cryobiology**, v. 31, n. 1, p. 39-46, 1994.  
DAPKIN, A; TEKÝN, N. The effect of egg yolk on the quality of frozen Angora buck semen. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.**, v. 20, n. 5, p. 395-398, 1996.

De BAULNY, B. O.; LABBÉ, C.; MAISSE, G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. **Cryobiology**, v. 39, p. 177-184, 1999.

De LEEUW, F. E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. In: INTERNATIONAL

CONFERENCE ON BOAR SEMEN PRESERVATION, 2., 1990, Beltsville-Maryland. **Proceedings...** Berlin: Paul Parey, 1991. p. 95-108.

DEKA, B. C.; RAO, A. R. Effect of glycerol level in TRIS-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. **Theriogenology**, v. 26, n. 2, p. 231-238, 1986.

DEVIREDDY; R. V.; SWANLUND, D. J.; OLIN, T.; VINCENTE, W.; TROEDSSON, M. H. T.; BISCHOF, J. C. **Biol. Reprod.**, v. 66, n. 1, p. 222-231, 2002.

DEVIREDDY, R. V.; SWANLUND, D. J.; ROBERTS, K. P.; BISCHOF, J. C. Subzero water permeability parameters of mouse spermatozoa in the presence of extracellular ice and cryoprotective agents. **Biol. Reprod.**, v. 61, n. 3, p. 764-775, 1999.

DEWIT, M.; MARLEY, W. S.; GRAHAM, J. K. Fertilizing potencial of mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. **Cryobiology**, v. 40, p. 36-45, 2000.

DICK, M. K.; BUHR, M. M. Phospholipase A<sub>2</sub> activity in fresh and cryopreserved spermatozoa from boars. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 59-64, 1994.

DROBNIS, E. Z.; CROWE, L. M.; BERGER, T. ANCHORDOGUY, T. J.; OVERSTREET, J. W.; CROWE, J. H., Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 265, p. 432-437, 1993.

EROGLU, A.; RUSSO, M. J.; BIEGANSKI, R.; FOWLER, A.; CHELEY, S.; BAYLEY, H.; TONER, M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163-167, 2000.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **S.Salamon-Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Acribia, 1987. 191 p.

FARSHAD, A. **Tiefgefrierkonservierung von Ziegensperma unter besonderer Berücksichtigung von Saccharose und Glycerin**. 1994. 133 f. Dissertação (Doutorado) - Georg-August-Universität, Goettingen. 1994.

FERRARI, S. **Dois tipos de diluidores e dois métodos de congelamento de sêmen de caprinos (Capra hircus, Linnaeus, 1758)**. São Paulo:FMVZ USP. 73p., 1993. Dissertação (Mestrado).

FERRARI, S.; LEINZ, F.; BARNABE, V. H. Inseminação artificial em cabras com sêmen congelado: resultados preliminares. **Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.**, v. 35, n. 5, p. 224-224, 1998.

FISER, P. S.; FAIRFULL, R. W. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. **Cryobiology**, v. 26, n. 1, p. 64-69, 1989.

FRASER, A. F. A technique for freezing goat semen and results of a small breeding trial. **Can. Vet. J.**, v. 3, n. 5, p. 133-144, 1962.

FRASER, L.; GORSZCZARUK, K.; STRZEZEK, J. Relationship between motility and membrane integrity of boar spermatozoa in media varying in osmolality. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 36, n. 6, p. 325-329, 2001.

GAO, D. Y.; ASHWORTH, E.; WATSON, P. F.; KLEINHANS, F. W.; MAZUR, P.; CRITSER, J. K. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. **Biol. Reprod.**, v. 49, n. 1, p. 112-123, 1993.

GAO, D. Y.; LIU, J.; LIU, C.; MCGANN, L. E.; WATSON, P. F.; KLEINHANS, F. W.; MAZUR, P.; CRITSER, E. S.; CRITSER, J. K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. **Hum. Reprod.**, v. 10, n. 5, p. 1109-1122, 1995.

GARDE, J.; GUTIERREZ, A.; ARTIGA, C. G.; VÁZQUEZ, I. Influence of freezing process on "in vitro" capacitation of ram semen. **Theriogenology**, v. 39, p. 225, 1993.

GILMORE, J. A.; JUNYUNG DU; JUN TAO; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. **J. Reprod. Fertil.**, v. 107, n. 1, p. 87-95, 1996.

GILMORE, J. A.; LIU, J.; GAO, D. Y.; CRITSER, J. K. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v. 12, n. 1, p. 112-118, 1997.

GILMORE, J. A.; LIU, J.; WOODS, E. J.; PETER, A. T.; CRITSER, J. K. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. **Hum. Reprod.**, v. 15, n. 2, p. 335-343, 2000.

GILMORE, J. A.; McGANN, L. E.; LIU, J.; GAO, D. Y.; PETER, A. T.; KLEINHANS, F. W.; CRITSER, J. K. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 53, n. 5, p. 985-995, 1995.

GRAVANCE, C. G.; WHITE, C.; ROBERTSON, K. R.; CHAMPION, Z. J.; CASEY, P. J. The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 49, n. 1, p. 37-43, 1997.

GUO, N.; PUHLEV, I.; BROWN, D. R.; MANSBRIDGE, J.; LEVINE, F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 168-171, 2000.

GUTHRIE, H.D.; LIU, J.; CRITSER, J.K. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1811-1816, 2002.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in farm animals**. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 509 p.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HAYS, L. M.; FEENEY, R. E.; CROWE, L. M. et al. Antifreeze glycoproteins inhibit leakage from liposomes during thermotropic phase transitions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 6835-6840, 1996.

HENRY, M., NEVES, J. P. (Ed.) **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 26, n. 1, p. 70-75, 1989.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; SRIVASTAVA, P. N. Phospholipids of rabbit and bull sperm membranes: structural order parameter and steady-state fluorescence

anisotropy of membranes and membrane leaflets. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 35, p. 209-217, 1993.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, n. 1-3, p. 3-22, 2000a.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47-58, 2000b.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Determination of lipid composition and thermal phase transition temperature in an enriched plasma membrane fraction from ram spermatozoa. **J. Reprod. Fert.**, v. 73, p. 285-294, 1985.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 51, n. 3, p. 414-424, 1994.

HONTORIA, F.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; AMAT, F. Trehalose prevents imbibitional damage in anhydrobiotic cysts of *Artemia* by depressing the phase transition temperature in lipids. **Ergebnisse der Limnologie**, v. 0, n. 52, p. 451-462, 1998.

JUNYUNG DU; KLEINHANS, F. W.; MAZUR, P.; CRITSER, J. K. Human spermatozoa glycerol permeability and activation energy determined by electron paramagnetic resonance. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1194, p. 1-11, 1994.

KESKINTEPE, L.; SIMPLÍCIO, A. A.; BRACKETT, B. G. Caprine blastocyst development after *in vitro* fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. **Theriogenology**, v. 49, p. 1265-1274, 1998.

KOSHIMOTO, C.; MAZUR, P. Effects of cooling and warming rate to and from  $-70^{\circ}\text{C}$ , and effect of further cooling from  $-70$  to  $-196^{\circ}\text{C}$  on the motility of mouse spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 66, n. 1, p. 1477-1484, 2002a.

KOSHIMOTO, C.; MAZUR, P. The effect of the osmolality of sugar-containing media, the type of sugar and the mass and molar concentration of sugar on the survival of frozen-thawed mouse sperm. **Cryobiology**, v. 45, p. 80-90, 2002b.

KULESHOVA, L. L.; MacFARLANE, D. R.; TROUNSON, A. O.; SHAW, J. M. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 119-130, 1999.

KUNDU, C. N. ; CHAKRABARTY, J.; DUTTA, P. ; BHATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G. C. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v. 40, n. 2, p. 117-125, 2000.

KUNDU, C. N.; CHAKRABARTY, J.; DUTTA, P.; BATTACHARYYA, D.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G. C. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. **Reproduction**, v. 123, n. 6, p. 907-913, 2002.

LADHA, S.; JAMES, P. S.; CLARK, D. C. et al. Lateral mobility of plasma membrane lipids in bull spermatozoa: heterogeneity between surface domains and rigidification following cell death. **J. Cell Sci.**, v. 110, p. 1041-1050, 1997.

LEBOEUF, B.; GUILLOUET, P. H.; BATELLIER, F.; BERNELAS, D.; BONNÉ, J. L.; FORGERIT, Y.; RENAUD, G.; MAGISTRINI, M. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**, v. 60, p. 867-877, 2003.

LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, n. 1-3, p. 113-141, 2000.

LESLIE, S. B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J. H.; CROWE, L. M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 61, n. 10, p. 3592-3597, 1995.

LESSARD, C.; PARENT, S.; LECLERC, P. et al. The protein P25b: a possible explanation of the lost of fertility of thawed bull sperm. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 347, 1999.

LEVIN, R. L.; MILLER, T. W. An optimum method for the introduction or removal of permeable cryoprotectants: isolated cells. **Cryobiology**, v. 18, n. 1, 32-48, 1981.



LIU, Z.; FOOTE, R. H.; BROCKETT, C. C. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. **Cryobiology**, v. 37, n. 3, p. 219-230, 1998.

LIU, Z.; FOOTE, R. H. Osmotic effects on volume and motility of bull sperm exposed to membrane permeable and nonpermeable agents. **Cryobiology**, v. 37, n. 3, p. 207-218, 1998.

LYNGSET, O.; AAMDAL, J.; VELLE, W. Artificial insemination in the goat with deep frozen and liquid semen after hormonal synchronization of oestrus. **Nord. Vet. Med.**, v. 17, n. 3, p. 178-181, 1965.

MARTINEZ, M.; DESCHAMPS, J. C.; BORDIGNON, V. et al. Efeito da trealose sobre a viabilidade de embriões congelados de suínos e de camundongos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 1, p. 40-44, 1999.

MATOS, D. G.; MOSES, D. F.; DE LAS HERAS, M. A; BALDASSARE, H. Minimal time required in contact with glycerol for cryopreservation of ram semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON REPRODUCTION, 12., 1992, The Netherlands. **Proceedings...** Netherlands: Hague, 1992. p. 1401-1403.

MAZUR, P.; COLE, K. W. Roles of unfrozen fraction, salt concentration, and changes in cell volume in the survival of frozen human erythrocytes. **Cryobiology**, v. 26, n. 1, p. 1-29, 1989.

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; CHU, E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. **Exp. Cell Res.**, v. 71, p. 345-355, 1972.

McGANN, L. E. Differing Actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 15, n. 4, p. 382-290, 1978.

McMULLEN, T. P. W.; LEWIS, R. N. A. H.; McELHANEY, R. N. Calorimetric and spectroscopic studies of the effects of cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of a homologous series of linear saturated phosphatidylethanolamine bilayers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1416, p. 119-134, 1999.

MEDRANO, A.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. **Reproduction**. v. 123, n. 2, p. 315-22, 2002

MEMON, M. A.; BRETZLAFF, K. N.; OTT, R. S. Effect of washing on motility and acrossome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. **Am. J. Vet. Res.**, v. 46, n. 2, p. 473-475, 1985.

MEMON; M. A.; OTT, R. S. Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. **World Vet. Anim. Prod.**, v. 17, n. 1, p. 19-25, 1981.

MERKT, H.; HANNIG, J.; BADER, H.; WEITZE, K. F. Reaction of bull sperms to deep-freezing. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.** v. 78, n. 4, p. 127-129, 1971.

MERYMAN, H. T. The exceeding of a minimum tolerable cell volume in hypertonic suspension as a cause of freezing injury. In: WOLSTENHOLME, G. E. H.; O'CONNOR, M. (Ed.). **The frozen cell**. CIBA Foundation Symposium. London: Churchill, 1970. p. 51-67.

MORANI, E. S. C. **Avaliação da fosfoetanolamina como crioprotetor do sêmen de *Bos taurus* e *Bos taurus indicus***. 2000. Dissertação (Mestrado) - FCAV, UNESP, Jaboticabal. 2000.

MORROW, D. A. **Current therapy in theriogenology**. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. 1143 p.

MULDREW, K.; Mc GANN, L. E. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. **Biophys. J.**, v. 66, p. 532-541, 1994.

NICOLAJSEN, H.; HVIDT, A. Phase behavior of the system trehalose-NaCl-water. **Cryobiology**, v. 31, n. 2, p. 199-205, 1994.

NOILES, E. E.; THOMPSON, K. A.; STOREY, B. T. Water permeability, Lp of the mouse sperm plasma membrane and activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. **Cryobiology**, v. 35, n. 1, p. 79-92, 1997.

NUNES, J. F.; CIRÍACO, A. L. T.; SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**. 2. ed. Fortaleza: LCR, 1997.

NUNES, J. F.; CORTEEL, J. M.; COMBARNOUS, Y.; BARIL, G. Rôle du plasma séminal dans la survie *in vitro* des spermatozoïdes de bouc. **Reprod. Nutr. Develop.** v. 22, n. 4, p. 611-620, 1982.

PALASZ, A. T.; THUNDATHIL, J.; De la FUENTE, J.; MAPLETOF, R. J. Effect of reduced concentrations of glycerol and various macromolecules on the cryopreservation of mouse and cattle embryos. **Cryobiology**, v. 41, p. 35-42, 2000.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PELLICER-RUBIO, M-T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-based extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethral lipase BUSgp60. **J. Reprod. Fertil.**, v. 112, p. 95-105, 1998.

PELLICER-RUBIO, M-T.; MAGALLON, T.; COMBARNOUS, Y. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1023-1031, 1997.

PERIS, S.; SOLANES, D.; PENA, A.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; RIGAU, T. Ion-mediated resistance to osmotic changes of ram spermatozoa: the role of amiloride and ouabain. **Theriogenology**, v. 53, p. 1453-1467, 2000.

PICKET, B. W.; SULLIVAN, J. J.; BYERS, W. W. et al. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 26, p. 167-174, 1975.

PINTADO, B.; PEREZ, B.; MATEOS, E. Effect of season on freezability of Verata buck spermatozoa. In: LOKESHWAR, R. R. (Ed.) **Recent advances in goat production**. New Delhi: Nutan Printers, p. 1140-1143.1992.

POTTS, R.J.; NOTARIANNI, L.J.; JEFFERIES, T.M. Seminal plasma reduces exogenous oxidative damage to human sperm, determined by the measurement of DNA strand breaks and lipid peroxidation. **Mutation Res.**, v.447, p.249-256, 2000.

PUROHIT, J. R.; BHOREKAR, M. R.; MANGURKAR, B. R. Studies on deep freezing of buck semen. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 5., 1992, New Delhi. **Pre-conference Proceedings...** Abstracts of contributory papers, vol. I, New Delhi: Nutan Printers, 1992. p. 290.

RANA, A. P. S.; MAJUMDER, G. C.; MISRA, S.; GHOSH, A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1961, p. 185-196, 1991.

RANA, A. P. S.; MISRA, S.; MAJUMDER, G. C.; GHOSH, A. Phospholipid asymmetry of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1210, p. 1-7, 1993.

RITAR, A. J.; BALL, P. D. The effect of freezing-thawing of goat and sheep semen at high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 31, p. 249-262, 1992.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of storage on viability of Angora goat spermatozoa. **Small Rumin. Res.**, v. 4, n. 1, p. 29-37, 1991.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 35, p. 305-312, 1982.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 36, p. 49-59, 1983.

ROCA, J.; CARRIZOSA, J. A.; CAMPOS, I.; LAFUENTE, A.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. **Small Rumin. Res.**, v. 25, n. 2, p. 147-153, 1997.

ROY, A. Egg yolk-coagulating enzyme in the semen and Cowper's glands of the goat. **Nature**, v. 179, p. 318-319, 1957.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. Storage of ram semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.

SANO, F.; ASAKAWA, N.; INOUE, Y.; SAKURAI, M. A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. **Cryobiology**, v. 39, p. 80-87, 1999.

SEGOVIA, M.; JENKINS, J. A.; PANIAGUA-CHAVEZ, C.; TIERSCH, T. R. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. **Theriogenology**, v. 52, p. 1489-1499, 2000.

SHIER, W. T. Studies on the mechanisms of mammalian cell killing by a freeze-thaw cycle: conditions that prevent cell killing using nucleated freezing. **Cryobiology**, v. 25, n. 2, p. 110-120, 1988.

SHUYANG HE; WOODS III, L. C. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiology**, v. 48, n. 3, p. 254-262, 2004.

SIMPLÍCIO, A. A.; MACHADO, R. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial na espécie caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., 1989, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1989. p. 171-177.

SLAVIK, T. Effect of glycerol on the penetration ability of fresh ram spermatozoa with zona-free hamster eggs. **J. Reprod. Fert.**, v. 79, p. 99-103, 1987.

SONGSASEN, N.; YU, I.; MURTON, S.; PACCAMONTI, D. L.; EILTS, B. E.; GODKE, R. A.; LEIBO, S. P. Osmotic sensitivity of canine spermatozoa. **Cryobiology**, v. 44, n. 1, p. 79-90, 2002.

SOUSA, W. H.; LEITE, R. M. H.; LEITE, P. R. M. Raça Boer – Caprinos tipo carne. **Documentos**, n. 21, EMEPA-PB, 1998.

STEPONKUS, P. A.; WIEST, S. C. Freeze-thaw induced lesions in the plasma membrane. In: LYOONS, J. M.; GRAHAM, D.; RAISON, J. K. (Ed.) **Low temperature stress in crop plants: the role of the membrane**. New York: Academic Press, 1979. p. 231-254.

STOREY, B. T.; NOILES, E. E.; THOMPSON, K. A. Comparison of glycerol, other polyols; trehalose; and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 37, n. 1, p. 46-58, 1998.

STROUD, R. M.; SAVAGE, D.; MIERCKE, L. J. W.; LEE, J. K.; KADEMI, S.; HARRIES, W. Selectivity and conductance among the glycerol and water conducting aquaporin family of channels. **FEBS Letters**, v. 555, n. 1, p. 79-84, 2003.

SZTEIN, J. M.; NOBLE, K.; FARLEY, J. S.; MOBRAATEN, L. E. Comparison of permeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 41, n. 1, p. 28-39, 2001.

THUNDATHIL, J.; GIL, J.; JANUSKAUSKAS, A. et al. Premature capacitation and fertility of frozen-thawed bull semen used in artificial insemination. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 351, 1999.

TREJO, A.; GRAJALES, L. H.; BARBA, C. G. Effect of kind of egg-yolk and centrifugation on motility recuperation of caprine frozen semen. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 5., 1992, New Delhi. **Pre-conference Proceedings...** Abstracts of contributory papers, vol. I, New Delhi: Nutan Printers, 1992. p. 309.

TREJO, A.; PERALTA, M.; CASTRO, P.; HERRERA, D. Frozen caprine semen in TRIS-egg yolk-based extenders. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 4., 1987, Brasília. **Proceedings...**, vol.II, Brasília: EMBRAPA-DDT, 1987. p.1499-1500.

TULI, R. K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, p. 547-555, 1994.

TULI, R. K.; HOLTZ, W. The effect of zwitterion buffers on the freezability of Boer goat semen. **Theriogenology**, v. 37, p. 947-951, 1992.

VAN DEN ABBEEL, E.; VAN DER ELST, J.; VAN STEIRTEGHEM, A.C. The effect of temperature at which slow cooling is terminated and of thawing rate on the survival of one-cell mouse embryos frozen in dimethyl sulfoxide or 1,2-propanediol solutions. **Cryobiology**, v.31, p.423-433, 1994.

TSVETKOVA, N. M.; PHILLIPS, B. L.; CROWE, L. M. et al. Effect of sugars on headgroup motility in freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: solid-state <sup>31</sup>P NMR and FTIR studies. **Biophys. J.**, v. 75, p. 2947-2955, 1998.

TULI, R.K.; HOLTZ, W. Effect of season on the freezability of Boer goat semen in the northern temperate zone. **Theriogenology**, v.43, n.6, p.1359-1363, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WATSON, P. F.; DUNCAN, A. E. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. **Cryobiology**, v. 25, n. 2, p. 131-142, 1988.

WEITZE, K. F. Damage through freezing and cryoprotection within the framework of deep freeze conservation of living materials with special reference to mammalian spermatozoa. **Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.**, v. 84, n. 10, p. 402-406, 1977.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 5, n. 6, p. 639-658, 1993.

WILLOUGHBY, C. A.; MAZUR, P.; PETER, A. T.; CRITISER, J. K. Osmotic tolerance limits and properties of murine spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 55, n. 3, p. 715-727, 1996.

WINDSOR, D. P. Mitochondrial function and ram sperm fertility. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 9, n. 3, p. 279-284, 1997.

WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; ENGEL, B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. **Cryobiology**, v. 35, n. 2, p. 93-105, 1997.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. **Cryobiology**, v. 39, n. 2, p. 103-129, 1999.

XIANG, T.-X.; XU, Y.-H.; ANDERSON, B.D. The barrier domain for solute permeation varies with lipid phase structure. *J. Membrane Biol.*, v.165, p.77-90, 1998.



## APÊNDICE 1

### Diluentes à base de TRIS-gema

Diluyente base:

TRIS-hidroxi-aminometano.....	3,786 g
Ácido cítrico.....	2,115 g
Frutose.....	1,0 g
Penicilina.....	500 UI/ml
Sulfato de Estreptomicina.....	500 µg/ml
Água destilada qsp. ....	100 ml

Diluyente TRIS-gema (TG):

Diluyente base.....	80 ml
Gema de ovo.....	20 ml

Diluyente TRIS-gema-glicerol (TGG):

TRIS-gema.....	93,2 ml
Glicerol.....	6,8 ml

Diluyente TRIS-gema + 600 mM sacarose:

Sacarose.....	21,24 g
TRIS-gema qsp.....	100 ml

Diluyente TRIS-gema + 600 mM trealose:

Trealose dihidratada.....	22,7 g
TRIS-gema qsp.....	100 ml

Os diluentes contendo sacarose ou trealose são adicionados em proporção 1:1, cinco minutos antes da congelação, ao sêmen diluído e resfriado por 2 h a 4°C em meio TRIS-gema.

## APÊNDICE 2

### Protocolo aplicado ao Experimento 1

