

CELY MARINI MELO

AÇÃO DOS CRIOPROTETORES NA BIOTECNOLOGIA DE SÊMEN CONGELADO

Botucatu-SP

2003

CELY MARINI MELO

AÇÃO DOS CRIOPROTETORES NA BIOTECNOLOGIA DE SÊMEN CONGELADO

Seminário apresentado à disciplina de Seminários I como parte integrante dos créditos do curso de Mestado junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus Botucatu, Área de Reprodução Animal.

Professores Responsáveis: Profa. Dra. Maria Denise Lopes

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu-SP

2003

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	3
2) PRINCÍPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO	4
2.1) DANOS A CÉLULA ESPERMÁTICA INERENTES A CRIOPRESERVAÇÃO	5
3) CRIOPROTETORES	6
3.1) MECANISMO DE AÇÃO	6
3.1.1) CRIOPROTETORES NÃO PENETRANTES	10
3.1.2) CRIOPROTETORES PENETRANTES	12
4) CONCLUSÃO	13
5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

1) INTRODUÇÃO

A tecnologia para armazenar o sêmen congelado foi revolucionada aproximadamente há cinquenta anos através da descoberta do glicerol como crioprotetor o que permitiu que o espermatozóide fosse congelado e armazenado por longos períodos (HOLT, 2000). Esta biotecnologia tem sido de grande importância em programas de melhoramento animal por viabilizar a preservação de material genético de animais em extinção, além de auxiliar a transpor barreiras da infertilidade masculina. No entanto, com exceção da espécie bovina, tem-se obtido baixas taxas de fertilidade com o emprego de sêmen congelado (WATSON, 2000), uma vez que a viabilidade e a fertilidade do espermatozóide após descongelamento encontram-se reduzidas como consequência das injúrias durante o processo de congelação (MEDEIROS, 2002).

Os eventos ocorridos durante a criopreservação envolvem os seguintes passos: redução da temperatura, desidratação celular, congelação e descongelação (MEDEIROS, 2002). Estes procedimentos ocasionam danos celulares devido a mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozóide, lesões no DNA, estresse osmótico além da toxicidade dos crioprotetores (BALL & VO, 2001). A célula espermática parece sensível ao estresse osmótico como também a adição e a remoção de crioprotetores (WATSON, 2000; BALL & VO, 2001).

O resfriamento quando efetuado de modo inadequado causa um choque térmico o qual induz a danos parcialmente irreversíveis ao espermatozóide que se caracteriza por padrão anormal de movimento do espermatozóide (movimento circular ou retrógrado), rápida perda da motilidade, lesões no acrossoma, dano a membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intacelulares. Muitos desses danos são decorrentes das alterações da membrana à medida que os espermatozóides progridem para as mudanças de fase de transição e durante o resfriamento (GRAHAM, 1996).

Com relação a formação de cristais de gelo, estes se formam no espaço extracelular criando um gradiente osmótico entre a solução intracelular inicialmente isotônica e a solução congelada extracelular que se encontra concentrada. Dependendo da velocidade de resfriamento, a água vai se mover através da membrana e se unir a fase congelada do meio extracelular ou irá se congelar, formando gelo no interior da célula. Na maioria dos casos, células submetidas a formação de cristais de gelo intracelular se tornam osmoticamente inativas ou lisadas devido a perda da integridade da membrana (DEVIREDDY *et. al.* 2002).

A célula espermática também é sensível aos efeitos tóxicos dos crioprotetores o que torna o uso de determinados componentes comumente utilizados para outras células inviáveis para os a célula espermática (WATSON, 2000).

2) PRINCÍPIOS DA CRIOPRESERVAÇÃO

Durante o processo de criopreservação, o sêmen deve ser resfriado da temperatura corpórea à temperatura ambiente ($37^{\circ} \rightarrow 20^{\circ} \text{C}$), o que parece não ocasionar danos ao espermatozóides quando este se encontra diluído em meio adequado (KEITH, 1998). O estresse inicial se dá quando o espermatozóide passa da temperatura corporal para 5°C (SQUIRES *et. al.* 1999). Isto é devido a fase de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino, para o estado de gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS, 2002). Para minimizar este efeito é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19° a 8°C e pela adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente (GRAHAM, 1996), além do uso de curvas de resfriamento lentas ($- 0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, o espermatozóide sofre um fenômeno conhecido como choque térmico, a qual induz a danos irreversíveis ao espermatozóides que se caracterizam por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou retrógrado), perda rápida de motilidade, danos do metabolismo, da membrana plasmática e do acrossoma (GRAHAM, 1996; SQUIRES, 1999).

Durante o processo de congelação a suspensão de espermatozóides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelação do meio (super resfriamento), antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar, ocorre um aumento na temperatura que é necessário para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para o espermatozóide, sendo minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelamento (SQUIRES, 1999). À temperaturas em torno de 5°C a água intra e extracelular permanece super resfriada e não cristaliza . Entre -5° a -10°C começam a se formar cristais de gelo no meio extracelular que permanece super resfriado, ocorre troca de água para manter o equilíbrio entre o meio extracelular e o intracelular ocasionando a desidratação celular. Neste ponto, a curva de congelação deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. Uma desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (MEDEIROS, 2002).

A perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de se formarem grandes canais de gelo dentro da célula que causariam danos as estruturas internas e/ou a membrana plasmática (SQUIRES, 1999).

A descongelação vai depender de como o sêmen foi congelado. Espermatozóides congelados em curvas moderadas necessitam de curvas adequadas de descongelação. Neste caso, como o gelo extracelular descongela lentamente, diluirá lentamente o soluto das frações de água não congeladas, o que permite que a água se difunda lentamente para dentro da célula, diluindo o soluto intracelular até atingir a concentração inicial. Se o espermatozóide é descongelado rapidamente, o gelo derrete rapidamente diluindo o soluto do meio e a água entrará muito rapidamente no espermatozóide, o qual se encontra altamente concentrado, danificando o espermatozóide (GRAHAM, 1996).

2.1) DANOS A CÉLULA ESPERMÁTICA INERENTES A CRIOPRESERVAÇÃO

Os danos causados ao espermatozóide durante o processo de criopreservação podem resultar na redução da proporção de espermatozóides viáveis, assim como na capacidade funcional destes (WATSON, 2000). As lesões ocasionadas pelo processo de congelação tem sido atribuídas as mudanças de temperatura, formação de cristais de gelo, danos oxidativos, alterações na membrana do espermatozóide e em seu DNA, toxicidade do crioprotetores e ao estresse osmótico (WATSON 1995, 2000). A célula espermática parece sensível ao estresse osmótico associado a adição e remoção de crioprotetores, assim como as alterações na concentração de soluto durante a congelação (WATSON, 2000).

Os efeitos deletérios dos crioprotetores estão relacionados a diversos fatores dentre os quais, o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, indução da fusão da mesma além da inibição da atividade enzimática (FAHY, 1986). Sua toxicidade pode resultar em desnaturação de proteínas e as alterações das interações da actina (FAHY, 1990). O glicerol induz a mudanças nos eventos citoplasmáticos por aumentar a viscosidade ao penetrar a célula espermática, causa alterações na polimerização da tubulina, na associação dos microtúbulos, no balanço bioenergético além de atuar diretamente de modo prejudicial na membrana plasmática, no glicocálix e nas proteínas de superfície celular (HAMMERSTEDT & GRAHAM, 1992).

Devido a permeabilidade da maioria dos agentes crioprotetores ser inferior a da água, ocorre um influxo de água o qual resulta no aumento do volume celular (BALL & VO, 2001). A

exposição das células a uma solução hiperosmótica é responsável pela remoção da água intracelular conseqüentemente ocorre o encolhimento celular e o influxo de íons, no entanto, a descongelação proporciona o efeito inverso, conseqüentemente há o influxo de água podendo acarretar na ruptura da membrana (HOLT, 2000b). O espermatozóide dos mamíferos comporta-se como um osmômetro linear, ocorrendo morte celular caso haja entumescimento ou encolhimento do mesmo quando submetido a níveis superiores da tolerância osmótica espécie específica. As lesões da membrana plasmática podem também estar relacionadas de maneira secundária ao rápido movimento da água através desta (BALL & VO, 2001).

3) CRIOPROTETORES

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio para que haja uma proteção do espermatozóide durante a criopreservação e o descongelamento (SQUIRES *et. al.* 1999; ARRUDA, 2000). São importantes para evitar a formação de gelo intracelular (MEDEIROS, 2002). Estes componentes são classificados como penetrantes e não penetrantes ou intra e extracelulares (GRAHAM, 1996; ARRUDA, 2000). O glicerol é o crioprotetor mais utilizado no congelamento de sêmen de garanhões, uma vez que atua na proteção das estruturas celulares, tanto intra como extracelularmente; este aumenta o número de canais de solvente que permanecem não congelados e dilui as altas concentrações de sal (GRAHAM, 1996).

Altas concentrações de crioprotetores são deletérias ao espermatozóides devido a sua toxicidade e podem resultar na redução da fertilidade após a inseminação artificial. Embora a função destes agentes seja a de maximizar os efeitos negativos, há evidências que o glicerol é tóxico para o espermatozóide. Parte da toxicidade é devida a injúria bioquímica, resultado da adição direta do crioprotetor sobre componentes subcelulares, apesar de ocorrerem danos osmóticos (ARRUDA, 2000).

3.1) MECANISMO DE AÇÃO

O modo pelo qual os crioprotetores atuam não se encontra totalmente elucidado. Acredita-se que estes reduzam o ponto de congelação da solução, o qual é determinado como a temperatura onde ocorre a formação dos primeiros cristais de gelo puro. Numa solução contendo glicerol, no momento em que ocorrer o congelação restará mais água

descongelada do que numa solução sem glicerol, havendo com isso, um aumento do volume dos canais de solvente não congelado e uma menor concentração de sais nesses canais (KEITH, 1998).

A estrutura molecular é um parâmetro importante para determinar a eficiência dos crioprotetores, uma vez que possuem afinidade pela água o que é devido a presença de grupamentos amina e hidroxila em sua composição, os quais favorecem a formação de pontes de hidrogênio com as moléculas de água (BAUDOT, *et al.*, 2002). Estas ligações alteram a orientação das moléculas de água dos cristais de gelo, criando um ambiente menos prejudicial às células (DALIMATA, 1997).

Os crioprotetores evitam a formação de gelo intracelular. O mais utilizado é o glicerol que semelhante aos agentes não penetrantes proporciona a desidratação celular através do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico o qual induz a saída de água das células espermáticas (KEITH, 1998).

Apesar de imprescindíveis para a sobrevivência dos espermatozóides no processo de congelação, os crioprotetores possuem efeitos tóxicos para o espermatozóide, tornando algumas substâncias utilizadas na criopreservação de outros tipos celulares impróprias para a célula espermática (WATSON, 2000). Até mesmo o glicerol deve ser utilizado com restrições devido ao seu efeito citotóxico (HOLT, 2000a). Em altas concentrações podem resultar na redução da fertilidade devido a sua toxicidade, a qual pode ser ocasionada pela lesão celular, por danos osmóticos e altas concentrações nas interações entre o espermatozóide e o trato reprodutivo da fêmea (GRAHAM, 1996).

3.1.1) CRIOPROTETORES NÃO PENETRANTES

Algumas substâncias, dentre as quais os lipídeos, proteínas e macromoléculas, são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelação sem que para isso necessitem penetrar no espermatozóide, são estes a gema de ovo, leite, alguns açúcares e a albumina sérica bovina (KEITH, 1998).

A gema de ovo é rotineiramente utilizada nos diluentes para criopreservação de sêmen de mamíferos com o intuito de proteger contra o choque térmico. Acredita-se que sua ação seja devida a presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais aderem a membrana celular durante o processo de criopreservação, preservando com isso, a membrana do espermatozóide (MOUSSA *et al.* 2002), atuando na superfície da membrana

plasmática, restaurando a perda de fosfolípidos e aparentemente induzindo a uma alteração transitória de sua composição, conseqüentemente prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTARD, 1996). Os fosfolípidos que compõem a fração LDL da gema de ovo protegem o sêmen especificamente durante o processo de resfriamento a 5°C. O uso de fosfatidilserina purificada tem demonstrado proteger as células espermáticas de bode e touros contra o choque térmico. Lipossomas que compõem o colesterol e a fosfatidilserina protegem o espermatozóide de bovinos e garantem os danos do processo de congelação possivelmente por prevenir das alterações deletérias durante a criopreservação (WILHELM *et al.*, 1996).

A prevenção conferida pelos lipídeos com relação ao choque térmico parece estar relacionada a quelação do íon Ca^{+2} do meio, evitando sua entrada no espermatozóide. É possível que os lipossomas interajam com o cálcio e outros componentes do meio de congelação que afetem a tonicidade ou a fração da água não congelada durante a criopreservação (WILHELM *et al.*, 1996).

Os diluentes usados na criopreservação de sêmen equino contêm entre 2 a 20% de gema de ovo. Os espermatozoides bovinos não sobrevivem ao congelamento e a descongelação sem a presença de gema de ovo, apesar do glicerol (KEITH, 1998).

Os açúcares atuam através da pressão osmótica na desidratação celular, reduzindo a água passível de ser congelada no interior da célula de modo a reduzir a injúria causada pela cristalização de gelo (AISEN, 2002). Além de atuarem como crioprotetores, os açúcares são substrato energético para o espermatozóide durante a incubação (YILDIZ *et al.*, 2000), conferem proteção à membrana plasmática durante a congelação e a descongelação através de interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolípidos. Por restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolípidos, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema. Geralmente os dissacarídeos, sacarose e trealose, são os mais efetivos em estabilizar a bicamada do que os monossacarídeos (DE LEEUW, 1993), mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e manutenção de lipídeos numa fase fluida na ausência de água (ANCHORDOGUY *et al.*, 1987; CROWE *et al.*, 1987).

Rafinose tem sido o açúcar mais utilizado na criopreservação de sêmen de ratos com o intuito de promover a hipertonicidade necessária para desidratar a célula antes da congelação (STOREY *et al.*, 1998). Seu uso na criopreservação de sêmen equino

demonstrou melhores resultados quando comparado a sacarose e sugeriu o uso de uma associação glicose-lactose-rafinose (NAGASE *et al.*, 1967).

Trealose confere proteção através do efeito osmótico e das interações específicas com os fosfolipídeos de membrana (KEITH, 1998; AISEN, 2002). Atua repondo a água da interface membrana-solução e também demonstra uma interação direta com os grupos polares dos fosfolipídeos durante desidratação e congelação reduzindo as interações de van der Waals entre as cadeias de hidrocarbonetos (AISEN, 2002), com isso estabilizando a membrana (STOREY *et al.*, 1998).

O uso de metil celulose em associação com acetamida e trealose na congelação de sêmen de coelhos elevou o número de células móveis após o congelamento em relação ao uso isolado da acetamida. O percentual de espermatozoides vivos com o acrossoma intacto também foi maior no diluente contendo metil celulose e trealose do que somente acetamida, o que demonstra que a combinação de crioprotetores confere uma maior proteção do que apenas a utilização de agentes penetrantes isoladamente e que alguns crioprotetores podem potencializar os efeitos de outros quando associados (DALIMATA & GRAHAM, 1997)

O leite vem sendo utilizado para diluir e armazenar o sêmen fresco ou resfriado. Ao utilizar um diluente a base de leite, glicose e glicerol na criopreservação de sêmen eqüino obteve-se um excelente resultado pós-descongelação (McCALL & SORENSEN, 1971).

Alguns aminoácidos como a glutamina, histidina e glicina betaína tem sido utilizados na criopreservação de sêmen de ovinos, garanhões e humanos (KUNDU *et al.*, 2001). O uso de L-glutamina a 80mM acrescido ao diluente INRA82 e glicerol melhorou significativamente a motilidade do sêmen de jumento após descongelação, não havendo diferença significativa no grupo controle e nos grupos contendo 160mM e 240mM de glutamina tiveram seus valores significativamente mais baixos (TRIMECHE *et al.*, 1996). Em eqüinos combinação dos aminoácidos glutamina , prolina , histidina e betaina ao meio INRA82 acrescido de 2,5% de glicerol e 2% de gema de ovo em concentrações diferentes concluiu-se que a glutamina e a prolina são mais eficientes do que a histidina e a betaina em aumentar os parâmetros pós-descongelação e que a adição de prolina e glutamina ao INRA82 proporcionou uma melhora significativa na motilidade pós-descongelamento do sêmen equino (TRIMECHE, 1998).

3.1.2) CRIOPROTETORES PENETRANTES

A descoberta da ação glicerol foi de grande importância na criopreservação de sêmen, pois até então este evento não era possível (KEITH, 1998; HOLT, 2000a), sendo atualmente o agente mais utilizado nas espécies mamíferas domésticas (FARSTARD, 1996).

Apesar de seu mecanismo de ação não se encontrar perfeitamente esclarecido, sabe-se que este penetra na membrana celular através da difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma (PARK & GRAHAM, 1992). Embora a concentração de crioprotetor seja elevada no meio, sua difusão é 30 a 60 vezes menor do que a da água (GRAHAM, 1996). Assim sendo, estas moléculas atravessam a membrana até atingir um equilíbrio, porém a água o faz mais rapidamente ocasionando o enrugamento da célula devido a pronta saída de água para diluir a alta concentração externa e somente depois de um período é que o crioprotetor penetra e equilibra as concentrações intra e extracelulares. Nessas condições a água retorna para o interior da célula até atingir um equilíbrio que resulta na retomada do seu tamanho normal (SEIDEL, 1986).

Além do seu efeito osmótico, parece atuar diretamente na membrana plasmática, havendo evidências de que o glicerol se liga aos grupos de cabeça dos fosfolípidos reduzindo a fluidez da membrana, interagindo com ligações protéicas e glicoproteicas da membrana da membrana (PARKS & GRAHAM, 1992).

O crioprotetor reduz o estresse osmótico através da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, interações com íons e macromoléculas, assim como redução do ponto de congelação da água (MEDEIROS *et al.*, 2002).

O uso do glicerol na criopreservação do sêmen equino pode estar relacionado a baixa motilidade pós descongelação e redução da fertilidade. O efeito tóxico do glicerol tem sido relatado por muitos autores; sua toxicidade parece causar desnaturação das proteínas, alteração nas interações de actina, além de ocasionar mudanças nos eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade pelo glicerol intracelular, modificações na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos, atuação direta na membrana plasmática, alterações no glicocálix e nas proteínas da superfície celular (ALVARENGA *et al.* 2000 a).

A concentração de glicerol ideal para a sobrevivência do espermatozóide é espécie dependente, variando de acordo com a curva de congelação, de outros componentes do diluente e ainda do método de envase. Em bovinos varia entre 7 a 9%, nos caprinos 3 a 4%,

ovinos ao se fazer uso de *pellets* obtém-se maior motilidade com o uso de 3 a 4% de glicerol, entre 6 a 8% em se tratando de ampolas, já as palhetas devem conter de 4 a 6% deste crioprotetor. O sêmen de humanos é congelado com 5 a 10 % de glicerol. Em eqüinos ocorre uma grande variação, sendo necessário o uso de um percentual inferior ao utilizado para bovinos (KEITH, 1998). Em cães o teor de glicerol varia de 2 a 10% (FARSTAD, 1996).

Num estudo comparativo do glicerol e outros crioprotetores dentre eles etileno glicol, dimetil formamida e dimetil sufóxido utilizando 10 ejaculados de 10 garanhões constatou-se a equivalência no uso dos crioprotetores, com exceção do dimetil sufóxido o qual manifestou resultado inferior (ALVARENGA *et al.*, 2000b). Outro estudo comparativo entre etileno glicol e glicerol demonstrou atuação semelhante destes, sendo que quando combinados possibilita a redução do teor de glicerol, diminuindo o seu efeito tóxico (ALVARENGA *et al.* 2000 a).

O uso de sêmen eqüino criopreservado com etileno glicol associado a um diluente contendo lactose e gema de ovo, resultou em gestação de 3 das cinco éguas do grupo testado (KOTYAGINA, 1963). Éguas inseminadas com sêmen congelado obtiveram 80 % prenhez tanto com sêmen congelado com glicerol como com etileno glicol (ROMBE *et al.*, 1965). Estes resultados concluem que o etileno glicol pode se usado na criopreservação do espermatozóide equino, uma vez que não interfere na sua fertilidade (KEITH, 1998).

Dimetil sufóxido é muito usado como crioprotetor, uma vez que penetra rapidamente na membrana plasmática. Para que um soluto atue desta maneira, é necessário que seja solúvel à membrana, assim como em água. Apresenta como inconveniente a capacidade de causar alterações na membrana, as quais danificam e inviabilizam as células, o que torna os crioprotetores penetrantes geralmente tóxicos para as células (WOLFE & BRYANT, 2001).

Tanto isoladamente como em associação com o glicerol, o dimetil sufóxido aumenta a motilidade pós descongelação do sêmen bovino. A combinação de ambos para o sêmen canino tem sido efetuada com êxito. Em células espermáticas de peixe, o dimetil sufóxido é usado em teores acima de 12,5%. Com relação a espécie eqüina, ao ser adicionado em concentrações entre 1 a 9% em um diluente contendo lactose, gema de ovo e citrato, combinado ou não com o glicerol, apresenta maior viabilidade espermática pós descongelação quando congelado com 5% de dimetil sufóxido, sendo este protocolo superior ao do uso isolado de glicerol (KEITH, 1998). Em coelhos os resultados não apenas de motilidade, como também de fertilidade tem sido alcançados através de crioprotetores como o dimetil sufóxido, etileno glicol e amidas (DALIMATA & GRAHAM, 1997).

Dimetil acetamida e o dimetil sufóxido tem sido uma alternativa na criopreservação de sêmen por não apresentar os efeitos tóxicos do glicerol (BLANCO *et al.*, 2000), sendo estes usados para congelar sêmen de peixe, como também o glicerol, metanol e o propileno glicol (BAUNLY *et al.*, 1999). A dimetil acetamida apresentou resultados superiores quando comparada ao glicerol ou ao dimetil sufóxido na congelação de espermatozoides de aves, obtendo o mesmo resultado para células espermáticas de truta, além da fertilidade e da viabilidade serem superiores quando comparadas com o glicerol e o dimetil sufóxido (KEITH, 1998).

Dimetil formamida e metil formamida são crioprotetores que vem sendo utilizados com grande sucesso na congelação de sêmen eqüino. Seu uso para congelação de sêmen de garanhões com boa congelabilidade não proporciona aumento da motilidade e sim resultados semelhantes ao glicerol (KEITH, 1998). No entanto, a utilização desses agentes em garanhões com baixa resistência ao processo de criopreservação manifesta melhores resultados quando comparados com o glicerol (GOMES *et al.* 2002).

O uso combinado de crioprotetores confere maior proteção em relação ao seu uso isolado (DALIMATA & GRAHAM, 1997). Assim sendo, a associação da dimetil formamida e do glicerol, conforme a composição do meio diluidor MP50, proporcionou uma melhor proteção da célula espermática durante a congelação, pois além da obtenção de excelentes resultados laboratoriais pós-descongelação manifestou índices de fertilidade superiores aos descritos na literatura. Este diluente combina os dois agentes citados sendo também enriquecido com açúcares e substratos de cultivo celular como fontes de macromoléculas, além da presença de gema de ovo e leite desnatado, de modo que a associação destes componentes, da dimetil formamida e do glicerol extremamente favorável a proteção do espermatozóide eqüino durante o processo de congelação (PAPA *et al.*2002).

4) CONCLUSÃO

O seminário intitulado: “Ação dos crioprotetores na biotecnologia do sêmen congelado” possibilita as seguintes conclusões:

- 1- Apesar de ter sido utilizado por um longo período, o glicerol somente agora começa a dar lugar a crioprotetores alternativos por apresentar altos níveis de toxicidade e influenciar negativamente a fertilidade do sêmen congelado eqüino.
- 2- Com a utilização de novos crioprotetores os quais apresentam menor toxicidade abrem-se novas perspectivas para a padronização da técnica de melhoria de congelação de sêmen nas diferentes raças eqüinas e na individualidade de garanhões, conseqüentemente melhoria nos índices de fertilidade com sêmen criopreservado nesta espécie.
- 3- Baseado na grande variabilidade de fertilidade com sêmen congelado na espécie eqüina é inevitável manter linhas de pesquisa para que se possa obter num curto espaço de tempo resultados satisfatórios nas constantes de prenhez com a biotecnologia de sêmen congelado eqüino.

5) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*, v.57, p.1801-1808, 2002.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet. J.*, v. 32(6), p.541-545, 2000a.

ALVARENGA, M.A.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, E.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. *Proc. Int. Congr. Anim. Reprod.*, p.157, 2000b. (abstract).

ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH, A.S.; CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipides during freezing. *Cryobiology*, v.24, p.324-331, 1987.

ARNS, M.J.; WEBB, G.W.; KREIDER, J.L.; POTTER, G.D.; EVANS, J.W. Use of different nonglycolysable sugars to maintain stallion sperm viability when frozen or stored at 37°C and 5°C in Bovine Serum Albumine medium. *J. Reprod. Fertil (suppl)*, v.35, p.135-141, 1987.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos dos diluentes e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso da microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análise computadorizada da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).** São Paulo, 2000, Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo.

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

BAUDOT, A.; CAULA, C.; DUARTE, M.L.; FAUSTO, R Thermal study of simple amino-alcohol solution, *Cryobiology*, v.44, p.150-160, 2002.

BAULNY, B.O.; LABBE, 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.

BLANCO, J.M.; GEE, G.; WILDT, D.E.; DONOGHUE, A.M. Species variation in osmotic cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.63, p.1167-1171, 2000.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; AURELLWISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.*, v.242, p.1-10, 1987.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*, v.48, p.831-841, 1997.

De LEEUW, F.E.; De LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v.30, p.32-44, 1993.

DENVIREDDY, R.V.; SWALUND, D.J.; OLIN, T.; VINCENT, W.; TROEDSON, M.H.T.; BISCHOF, J.C.; ROBERTS, K.P. Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined used differential scanning calorimetry. *Biology of Reproduction*, v.66, p.222-231, 2002.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, v.3, p.1-13, 1996.

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGAS, M.S.; MERYMAN, H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, v.27, p.247-268, 1990.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.251-260, 1996.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, v.58, p.277-279, 2002.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North. Am.: Equine Practice*, v.12, p.131-147, 1996.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, v.29, p.26-28, 1992.

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

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

KEITH, S.L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Colorado, 1998. 104p. Tese (Master of Science). Colorado State University, Fort Collins.

KOTYAGINA, V.; PLATOV, E.; ROMBE, S. The fertility of stallion semen preserved at a temperature of -78°C. *Anim Breed Abstr*, v.31, p.458, 1963.

KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUMDER, G.C. Effect of amino acid on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using chemically defined model system. *Cryobiology*, v.41, p.21-27, 2001.

LOVELOCK, J.E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. *Biochem. J.*, v.58, p.618-622, 1954.

McCALL, J.P.; SORENSEN, A.M. Evaporated milk as an extender for stallion semen. *AI Digest*, v.12, p.8-10, 1971.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, 327-344, 2002.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.

NAGASE, H.; YAMASHITA, S.; TRIE, S. Protective effects of sugar against freezing injury of bull spermatozoa. *Proceeding 6th Int. Cong. Anim. Reprod. and AI*, v.2, p.1111-1113, 1968.

NAGASE, H. Studies on the freezing of stallion semen. I.Fertility results with stallion semen frozen in concentrated pellets form. II.Factors affecting survival rates of stallion spermatozoa after freezing and thawing and results of a fertility trial. *Anim. Breed. Abstr.*, v.35, p.195, 1967.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA Jr, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, n.3, p.184-187, 2002.

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

ROMBE, S.; KOTJAGINA, V.; PILER, N. An Improvement method of preserving semen at -79°C. *Anim Breed Abstr*, v.33, p.363, 1965.

SEIDEL, G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: THECNQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS, 1996, Fort Collins. *Proceedings...*Fort Collins:Colorado State University, p.6-16, 1996.

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

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Principles of cryopreservation. In: *Cooled and frozen Stallion Semen*, b.09, 1999.

TRIMECHE, A.; YVON, J.M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E. MAGISTRINI, M. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.52, p.181-191, 1990.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LANNOU D.Le.; BARRIÈRE, P.; TAINURIER, D. Improvement of motility of post-thaw poitou jackass sperm using using glutamine. *Theriogenology*, v.45, p.1015-1027, 1996.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.481-492, 2000.

WILHELM, K.M.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. *Cryobiology*, v.33, p.320-329, 1996.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Celular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration*, v.24, p.438-450, 2001.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, v.54, p.579-585, 2000.