

**PAULA KAROLINA RANGEL AMORIM**

**EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE  
CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO  
ESPERMATOZÓIDE EQÜINO (*EQUUS CABALLUS*)**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ**

**2006**

**PAULA KAROLINA RANGEL AMORIM**

**EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE  
CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E FUNCIONAIS DO  
ESPERMATOZÓIDE EQÜINO (*EQUUS CABALLUS*)**

Monografia apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia Celular.

**ORIENTADOR: PROF. Dr MARIA LUISA LÓPEZ ALVAREZ**

**CO-ORIENTADOR: PROF. Dr CLAUDIO ANDRÉS RETAMAL MARTÍNEZ**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINESE  
CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ**

**2006**

# **PAULA KAROLINA RANGEL AMORIM**

Monografia apresentada ao  
Centro de Biociências e  
Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense,  
para obtenção do Grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 23 de março de 2006.

Comissão Examinadora:

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr. Isabel Nunes da Cunha**

---

**Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr. Maria Luisa López Alvarez (orientadora)**

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de biologia celular e tecidual, no setor biologia da reprodução do centro de biociências e biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense sob orientação dos pesquisadores Maria Luisa López Alvarez e Claudio Andrés Retamal Martínez.

Apoio Financeiro:

CNPQ

UENF

FAPERJ

TECNORTE

Dedico, aos meus pais,  
Paulo e Zelinda, Por terem me  
transmitido os valores mais  
importantes: amor, amizade,  
carinho, compreensão, perdão,  
companheirismo, honestidade e  
principalmente a paciência.  
Obrigada !!!!

## AGRADECIMENTOS:

Primeiramente a DEUS, por me oferecer à sabedoria, fé e humildade.

À minha família: meu pai e minha mãe, meus irmãos e ao meu noivo, em que todos os momentos me apoiaram e me fortaleceram com muito amor e carinho. Com ausência de vocês eu nada seria. Obrigada por existirem em minha vida!

À professora Maria Luisa López, pela orientação, grande amizade, conselhos e confiança.

Ao professor Cláudio Andrés Retamal Martínez, pela amizade e orientação.

Aos amigos de laboratório: Nathália Curty, Thaisa Domingos, Fernanda Brasil, Fernanda Ventorim, Fernanda Rodrigues, Roberta Fernandes, Tânia Carvalho. Glauber Dias, Joseph Albert, André Teixeira, Renata Vasconcelos e Laura Faria. Obrigada pela amizade e paciência comigo!

Ao Arthur Rodrigues técnico do laboratório pela amizade e auxílio na preparação de soluções.

Aos professores e alunos do LMGA, Frederico Straggiotti, Angelo Dias, Cláudio Wermelinger, Edér Batalha, Daniel Lucif, Guilherme Valente e Maurício van Tilburg que sempre estiveram a disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre reprodução animal e na ajuda nas coletas das amostras.

Às amigas da “ex-republica Meninas do VC”: Shayany Felix, Ana Carolina Mercadante e Gabriela Raposo, que me fortaleceram seja com apoio nas horas difíceis, ou mesmo com as risadas nos momentos de descontração. Aquilo que vivemos jamais voltará...

Aos garanhões e seus respectivos donos.

A TECNORTE e FAPERJ pelo auxílio financeiro.

“Apesar dos nossos sentimentos de invencibilidade e imortalidade, nossa existência é muito mais frágil do que podemos imaginar”.

(Greive, B.T.,2002)

## RESUMO

A criopreservação de sêmen é uma tecnologia de grande impacto na indústria agropecuária, principalmente na bovinocultura. Entretanto, o grande sucesso do congelamento de sêmen bovino não tem sido atingido na espécie eqüina. Existe uma série de fatores que limitam sua utilização em inseminação artificial (IA), dentre eles o menor potencial fertilizante do sêmen criopreservado. A análise do sêmen é um procedimento rotineiro na avaliação do potencial fertilizante de um reprodutor. Porém, há controvérsia não só em relação à importância dos vários parâmetros do espermiograma na predição de fertilidade, mas também sobre os conceitos de subfertilidade, infertilidade e fertilidade ótima. O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito da criopreservação nas características estruturais e funcionais do espermatozóide. Nossos resultados demonstraram que motilidade progressiva e o vigor diminuem significativamente após o congelamento / descongelamento das amostras. A susceptibilidade dos espermatozoides aos efeitos osmóticos, choque térmico e outras injúrias que o processo produz, difere entre animais e ejaculados do mesmo garanhão. No mesmo grupo de animais avaliados, 36% deles obtiveram uma motilidade progressiva compatível com a requerida em IA; 21% apresentaram uma resposta moderada ao congelamento e em 43% dos garanhões os espermatozoides mostraram escassa motilidade e viabilidade após a criopreservação. Apesar de que os ensaios de desidratação *in vitro* mostraram uma grande resistência do núcleo espermático aos agentes redutores de S-S, a cromatina nuclear foi afetada pelo procedimento (SCSA). Os testes de HOS, MEV, perfil protéico, glicoproteico e enzimático das amostras mostram que a integridade estrutural e funcional da membrana também é seriamente alterada. Proteólise e diferenças no comportamento eletroforético de algumas proteínas foram detectadas. A utilização de metodologias complementares ao espermiograma de rotina, o melhor conhecimento do efeito da criopreservação nas características seminais, bem como o aperfeiçoamento desta técnica, serão de grande valor na aplicação desta importante atividade biotecnológica.



## ABSTRACT

The cryopreservation of semen is a technology of great impact in the farming industry, mainly in the bovine culture. However, the great success of the bovine freezing semen has not been reached in the equine species. There are many factors that limit its use in artificial insemination (AI), amongst them exists the fertilizing potential reduced of the cryopreserved semen. The analysis of the semen is a routine procedure in the evaluation of the fertilizing potential of a reproducer. However, not only exist controversy in relation to the importance of the some parameters of the semen analysis in the prediction of fertility, but also on the concepts of subfertility, infertility and excellent fertility. The aim of this work was to analyze the effect of the cryopreservation in the structural and functional characteristics of the spermatozoa. Our results have demonstrated that progressive motility and the vigor reduce significantly after freezing / thawing of the samples. The susceptibility of the spermatozoa to the osmotic effect, thermal shock and other injuries that the freezing produces, differs between different animals and ejaculates from the same animal. In the evaluated animals group, 36% of them have gotten a compatible progressive motility with required in AI; 21% have presented a moderate reply to the freezing and in 43% of the animals the spermatozoa have showed scarce motility and viability after the cryopreservation. Although in vitro decondensation assays have showed a great resistance of the spermatid nucleus to S-S- reducing agents, the nuclear chromatin was affected by the procedure (SCSA). The hyposmotic tests, scanning electron microscopic, protein, glycoprotein and enzymatic profile of the samples showed that the structural and functional integrity of the membrane was modified. Proteolyses and differences in the electroforetic profile of some proteins have been detected. The use of complementary methodologies in semen analysis, the best knowledge of the effect of cryopreservation in seminal characteristics, as well as the perfectioning of these techniques, will be of great value in the application of this important biotechnological activity.

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| I Introdução  | 1  |
| II Revisão Bibliográfica  | 3  |
| 1 Criopreservação de sêmen  | 3  |
| 2 Crioprotetores e diluentes  | 7  |
| 3 Efeito do Congelamento na estrutura espermática                     | 9  |
| III Objetivos   | 11 |
| IV Materiais e Métodos  | 12 |
| 1 Materiais   | 12 |
| 2 Metodologias  | 12 |
| 1 Obtenção de Amostras  | 16 |
| 2 Análise Seminal   | 13 |
| 3 Análise Estatística   | 14 |
| 4 Diluição e Congelamento do Sêmen                                    | 15 |
| 5 Extração de Proteínas   | 15 |
| 6 Detecção da Atividade Glicosidásica                                 | 16 |
| 7 Análise Eletroforética de Proteínas Espermáticas                    | 17 |
| 8 Análise Densitométrica  | 18 |
| 9 Teste de Estabilidade da Cromatina Específica (SCSA)                | 18 |
| V Resultados  | 20 |
| 1 Efeito da criopreservação nas características espermáticas          | 20 |
| 2 Efeito da criopreservação na estabilidade da cromatina espermática  | 24 |
| 3 Efeito da criopreservação na integridade do DNA                     | 31 |
| 4 Efeito da criopreservação no perfil eletroforético de proteínas     | 36 |
| 5 Efeito da criopreservação na atividade de glicosidases espermáticas | 39 |
| VI Discussão e Comentários  | 43 |
| VII Conclusão   | 51 |
| VIII Referências Bibliográficas                                       | 52 |

## I. INTRODUÇÃO

O grande progresso alcançado na área de produção animal está fortemente ligado ao estudo da fisiologia reprodutiva das espécies, ao manejo dos reprodutores, bem como à aplicação de diversas biotécnicas. Atualmente, metodologias como a inseminação artificial, indução e sincronização do cio, resfriamento e congelamento de sêmen, transferência de embriões, entre outras, são freqüentemente utilizadas na prática veterinária.

A criopreservação de sêmen é uma tecnologia de grande impacto na indústria agropecuária, principalmente na bovinocultura, uma vez que permite maior disseminação do material genético de animais de elevado potencial produtivo bem como o armazenamento de material genético de animais que não possam, temporariamente ou permanentemente, ser utilizados com fins reprodutivos. Entretanto, o sucesso do congelamento de sêmen bovino não tem sido atingido na espécie eqüina. Esta diferença pode ser devida, não só a diferenças na seleção dos animais, mas também a características próprias do espermatozóide. Diversos autores têm demonstrado que a criopreservação impõe efeitos deletérios nos gametas, alguns bastante evidentes, enquanto outros são sutis e difíceis de serem detectados. O resultado é o baixo índice de prenhez, em torno de 40%, que os produtores conseguem por ciclo reprodutivo da égua (GRAHAM, 1996; SNOECK e HENRY, 2001). O menor potencial fertilizante do sêmen criopreservado, a proibição do uso do sêmen congelado em algumas associações de raças, o maior custo da manutenção das amostras criopreservadas, o custo de sincronização do cio e controle folicular da égua, a necessidade de compatibilizar as datas de ovulação e inseminação, entre outras dificuldades, têm limitado a utilização desta técnica na inseminação artificial de eqüinos (LOOMIS, 2001; CARNEIRO, 2002).

Na eqüinocultura, o interesse pela criopreservação de sêmen cresceu significativamente depois que duas das maiores associações de criadores a “American Quarter Horse” e a “American Paint Horse”, aceitaram o uso de sêmen resfriado e congelado como método de produzir potros registrados.

Diversos autores têm evidenciado a reduzida capacidade do espermatozóide eqüino em tolerar os processos de congelamento e descongelamento, expressada

principalmente por parâmetros funcionais como vitalidade, motilidade e potencial fertilizante das amostras criopreservadas (AMMAN e PICKET, 1987; PALMER e MAGISTRINI, 1992; AURICH *et al.*, 1996; DENNISTON *et al.*, 1997; VIDAMENT *et al.*, 1997; BLOTTNER *et al.*, 2001). Contudo, independentemente do processamento e a metodologia aplicada, existe uma grande variabilidade entre garanhões e, entre ejaculados de um mesmo garanhão, quanto à sensibilidade do sêmen ao congelamento.

A reduzida fertilidade dos espermatozóides criopreservados é geralmente atribuída a mudanças nas características biofísicas e bioquímicas de suas membranas, que resultam numa baixa resistência do gameta ao choque térmico (AMMAN e PICKETT, 1987; PARKS e GRAHAM, 1992; WATSON, 1995). Nos últimos anos tem se observado um crescente interesse por avaliar o efeito da criopreservação na estrutura de proteínas e glicoproteínas da membrana plasmática, tendo em vista que a degradação de proteínas chave poderia resultar na perda de motilidade e do potencial fertilizante (CHATTERJEE e GAGNON, 2001; ZILLI *et al.*, 2005). Outros pesquisadores têm focalizado seu estudo no efeito da criopreservação sobre o núcleo espermático. Apesar da grande estabilidade desta estrutura, alguns trabalhos mostraram instabilidade da cromatina e ruptura do DNA após a criopreservação do sêmen (JIANG *et al.*, 2005). Acredita-se que cada estrutura celular responde de forma diferente ao congelamento / descongelamento das amostras. No entanto, poucos estudos existem sobre esse aspecto e pouco se conhece sobre a natureza e mecanismos dos danos provocados por este processo.

O propósito deste trabalho é analisar o efeito da criopreservação em algumas características do espermatozóide de *Equus caballus*. O estudo do efeito da criopreservação na integridade e funcionalidade da membrana, na cromatina nuclear, entre outros componentes do gameta pode ser de grande valor não só no diagnóstico de problemas de fertilidade, mas também na avaliação de possíveis doadores em programas de inseminação artificial.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### I. CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

A criopreservação de espermatozóides é um processo que visa manter a função espermática, por um longo período de tempo, mediante o congelamento e armazenamento destas células a temperaturas muito baixas, da ordem de  $-196^{\circ}\text{C}$ . Este processo surgiu no fim do século XVIII. No entanto, começou a ser aplicado após a difusão dos trabalhos de Polge *et al.*, (1949) que verificaram acidentalmente que as células espermáticas se recuperavam após o congelamento em presença de glicerol.

O descobrimento das propriedades crioprotetoras do glicerol e a disponibilidade de gases líquidos, especialmente o nitrogênio, estimulou a criação de bancos de esperma e a pesquisa nesta área. A grande vantagem do congelamento de espermatozóides é a possibilidade de armazenamento dessas células por tempo indefinido permitindo sua utilização em momento oportuno, além de garantir a conservação das características genéticas de um reprodutor que por afecções, doenças ou morte poderiam ser perdidas. Apesar da diminuição na motilidade dos espermatozóides criopreservados, os avanços nas técnicas de fertilização assistida têm permitido conseguir resultados promissores.

Na agroindústria tem sido especialmente utilizada na produção de bovinos, suínos, caprinos, aves de granja, bem como para perpetuar linhagens de animais geneticamente superiores, de espécies exóticas ou em vias de extinção. O congelamento de sêmen possibilita a redução nos custos de transporte de material genético animal, facilitando procedimentos de importação e exportação desse material. No entanto, no dia a dia seu uso é mais limitado, já que o índice de nascimentos obtido tem desanimado os produtores (ROBAIRE e VIGER, 1995; CURRY, 2000).

O primeiro relato de prenhez obtida com sêmen congelado de garanhão foi publicado por Baker e Gandier, (1957). No Brasil, o método de congelamento e armazenamento de sêmen eqüino foi introduzido na década de 80, sendo desenvolvido no Departamento de Reprodução Animal da UNESP (PAPA, 1988).

Desde a primeira criopreservação de espermatozóides, o conhecimento sobre mecanismos de crioinjúria tem sido crescente e conseqüentemente a procura de métodos de criopreservação tem sido mais intensa. Contudo, ainda é pouco o que se conhece sobre os eventos físicos e químicos que ocorrem durante o congelamento, armazenamento e descongelamento das amostras (HOLT, 2000).

No processo de criopreservação, o sêmen deve ser primeiramente resfriado (da temperatura corpórea para a temperatura ambiente). Este resfriamento aparentemente não causa danos aos espermatozóides, desde que estejam diluídos em meio adequado. Existe, porém, uma faixa crítica de temperatura de refrigeração na qual a célula pode sofrer choque térmico e ser severamente danificada, perdendo conseqüentemente a motilidade e potencial fertilizante (WATSON, 1995). Os danos causados pelo choque térmico incluem lesões na membrana espermática, redução do metabolismo de carboidratos e perda de componentes (proteínas, lipídeos, enzimas), entre outros (DROBINSK *et al.*, 1995). Estes danos podem ser minimizados através de um resfriamento controlado e do uso de crioprotetores no meio diluente (WATSON, 1995).

A água pura se congela e forma cristais a 0°C, enquanto o ponto de congelamento de uma solução é determinado pela concentração de solutos nela contida. Conforme as moléculas de água pura cristalizam, a concentração de solutos nas frações fluidas remanescentes do meio, aumenta, diminuindo assim o seu ponto de congelamento. A concentração de sais numa solução fisiológica, que é em torno de 0,15M em temperatura ambiente, pode aumentar até 2,6 M quando a temperatura é reduzida para -10°C (MAZUR, 1984). Por tanto, o dano causado durante os processos de congelamento e descongelamento pode ser devido à formação intracelular de cristais de gelo, à concentração de solutos resultante do congelamento da água pura e à interação destes dois fatores. Segundo Mazur (1984), em temperaturas acima de -10 °C, o processo de congelamento não consegue atingir o interior da célula, que se torna super-resfriada, porém não congelada. Conforme a temperatura continua baixando e a concentração do meio extracelular aumenta, a água deve sair da célula ou haverá formação de cristais de gelo. O que acontece nesse ponto depende da curva de resfriamento. Existe uma curva ótima para o congelamento de células que depende de sua razão

superfície/volume e da permeabilidade da membrana plasmática a água. Numa curva de resfriamento lenta ( $< -0,5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ), a água se difunde para o exterior da célula para atingir o equilíbrio devido à alta concentração de solutos no meio extracelular. Desta forma, os espermatozóides se desidratam e não se formam grandes cristais intracelulares de gelo (AMMAN e PICKETT, 1987). Esta desidratação pode resultar em altas concentrações de soluto, provocando o chamado efeito de solução, que também é prejudicial à célula (WATSON, 1995). Por outro lado, numa curva de congelamento muito rápida ( $> -0,6^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) não há tempo suficiente para que ocorra a desidratação celular e, em alguma temperatura abaixo de  $-10^{\circ}\text{C}$  ocorrerá o congelamento da solução intracelular. A extensão do grau dos danos causados pelo gelo intracelular dependerá do grau de formação de gelo e do tamanho dos cristais. Grandes cristais de gelo podem causar danos mecânicos às células, sendo uma das principais causas de morte celular durante o congelamento, enquanto os pequenos cristais podem não ser deletérios. Entretanto, durante o reaquecimento, o crescimento destes pequenos cristais pela recristalização pode causar danos severos (MAZUR, 1984).

A sobrevivência dos espermatozóides durante o descongelamento depende de sua resistência em passar novamente pela faixa crítica de temperatura. A curva preferencial de aquecimento depende da curva em que o sêmen foi congelado (AMMAN e PICKETT, 1987). Se o congelamento foi lento, o descongelamento deve também ser lento para permitir o descongelamento dos cristais de gelo extracelulares. O descongelamento destes cristais provoca a diluição dos solutos e lentamente ocorre a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado muito rapidamente, os cristais extracelulares descongelam-se muito rapidamente e a água do meio invade bruscamente as células, causando danos à membrana plasmática. Se o sêmen tiver sido congelado rapidamente, os espermatozóides não terão sofrido desidratação e, por tanto, quando o gelo extracelular se derreter, não haverá influxo rápido de água através da membrana celular (AMMAN e PICKETT, 1987). Por tanto, o sêmen congelado rapidamente deve ser também descongelado rapidamente de forma que o gelo intracelular formado durante o congelamento não tenha tempo de recristalizar (AMMAN e PICKETT, 1987; WATSON, 1995).

Como vemos a crioinjúria está relacionada com a velocidade de resfriamento (MAZUR, 1984; LEIBO, 1976; WATSON, 1995), portanto o mais recomendável é a construção de curvas ótimas de congelamento. No entanto, estas têm funcionado melhor para embriões e ovócitos que para espermatozóides. O cálculo dos fluxos de água através da membrana depende da derivação de parâmetros específicos da membrana, da condutibilidade hidráulica e da energia de ativação. No espermatozóide estes parâmetros variam nos diversos domínios da membrana plasmática. Além disso, interações dos lipídeos de membrana com os crioprotetores como o glicerol, podem, por exemplo, afetar esses parâmetros.

Diversos protocolos de congelamento / descongelamento para o sêmen eqüino têm sido propostos, porém não há ainda uma metodologia que garanta bons índices de prenhez. Além disso, as características dos espermatozóides sobreviventes são diferentes a aquelas células que não foram submetidas ao estresse da criopreservação, diminuindo o potencial fertilizante da amostra (WATSON, 1995). A fertilização requer que espermatozóide e ovo se encontrem na ampola do oviduto, tendo completado seu processo de maturação. Para ovuladores induzidos, como coelhos ou gatos, a ovulação é desencadeada pelo cruzamento permitindo que a maturação e capacitação dos gametas sejam sincronizadas. Porém, para muitas espécies a situação é mais complexa. A fêmea pode ser receptiva por um período de estro prolongado e a ovulação pode ocorrer em qualquer momento dentro deste período. Com tempos de inseminação e ovulação variáveis, o espermatozóide deve sobreviver no trato da fêmea e ser funcionalmente competente por vários dias. A heterogeneidade da população espermática, quanto ao grau de maturidade de cada gameta, favorece a fertilização após monta natural, mas não está esclarecido se esta característica se mantém após congelamento e descongelamento das amostras (CURRY, 2000).

Análises de espermatozóides pós-congelamento mostram diferenças nas características de superfície, quando comparadas com amostras frescas, que poderiam estar relacionadas com uma menor heterogeneidade da população espermática (OLLERO *et al.*, 1998). A perda da heterogeneidade poderia se dar de duas formas: o processo de congelamento / descongelamento afetaria diferencialmente uma subpopulação de células (mais sensíveis) selecionado uma



outra crioresistente, mas não necessariamente fértil. A outra possibilidade é que o processo afete todas as células de tal forma que mascare as pequenas diferenças entre elas, tornando-se uma população mais homogênea (CURRY, 2000).

Diversos autores têm assinalado que espermatozoides criopreservados sofrem capacitação prematura, o que diminuiria a capacidade de união às células epiteliais do oviduto (CURRY, 2000) interferindo na sua sobrevivência, já que têm se demonstrado que as interações com este epitélio prolongariam a vida do espermatozoide (THOMAS *et al.*, 1995; DROBINSK *et al.*, 1995; SUAREZ *et al.*, 2001). Problemas de fertilidade derivados dessas alterações podem ser diminuídos sincronizando inseminação e ovulação (CURRY, 2000).

No intuito de maximizar a sobrevivência do gameta, diversos protocolos de congelamento têm sido estudados, buscando minimizar os danos causados pelo choque térmico, formação de cristais, desidratação celular e estresse osmótico (JASKO, 1994). Porém, maiores esforços devem ser realizados não só para compreender as causas da crioinjúria, mas também no intuito de aperfeiçoar as técnicas de criopreservação, procurando protocolos mais eficientes para cada espécie em particular.

## II. CRIOPROTETORES E DILUENTES

Os crioprotetores são substâncias que se ligam à água, alterando seu ponto de fusão e interferindo no ponto de cristalização. Removem os núcleos de cristalização e diminuem a faixa crítica de temperatura na qual se formam cristais, causadores da crioinjúria (BENCHIMOL, 1996). Na espécie eqüina o crioprotetor mais utilizado é o glicerol (MILLER e MASSUI, 1982; VIDAMENT *et al.*, 1997; COTTORELLO e HENRY, 2002). Porém, as bases de suas propriedades como tal e o porquê de ser mais efetivo que outros, não estão esclarecidos.

A característica mais importante de um crioprotetor é a afinidade pela água. Dalimatia e Graham (1997) assinalam que os crioprotetores intracelulares, moléculas que atravessam facilmente a membrana plasmática, se ligam às moléculas de água através de pontes de hidrogênio, o que alteraria a orientação dos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo. Entretanto os crioprotetores extracelulares,

moléculas de alto peso molecular que exercem seu efeito crioprotetor sem penetrarem na célula, (Ex: lipoproteínas da gema de ovo e do leite) protegem via efeitos osmóticos. Isto é, promovem um meio hipertônico que induz a saída de água das células, levando a desidratação dos espermatozóides e reduzindo a probabilidade de formar grandes cristais de gelo em seu interior (AMMAN e PICKETT, 1987).

O espermatozóide tem alta permeabilidade à água, provavelmente pela presença de canais de água formados pela proteína Aquaporina 7 (AQP7) (ISHIBASHI *et al.*, 1997). No entanto, o espermatozóide é insensível à inibição por cloreto de mercúrio, característica consistente com presença de canais APQ7 (CURRY, 2000).

Apesar de o glicerol ser tóxico e comprometer a fertilidade acelerando a reação acrossômica (SLAVICK, 1987; AMANN e PICKETT, 1987), continua sendo utilizado já que não foi encontrado um crioprotetor mais eficiente. Devido a sua alta toxicidade, a concentração de glicerol deve estar entre a mínima necessária para promover a proteção, e a máxima permitida para não causar danos aos espermatozóides. Contudo, a sensibilidade do espermatozóide a efeitos tóxicos varia com as espécies, com a curva de congelamento utilizada, com a presença de outros componentes no meio e com o método de envasamento (WATSON, 1995). Segundo Vidament *et al.* (1997) a concentração recomendável de glicerol nos diluidores de sêmen de eqüino pode variar de 3,5-5%.

Outros crioprotetores testados: etilenoglicol, acetamida, metil acetamida, formamida, metilformamida e dimetilformamida não apresentaram vantagens significativas quando comparadas com glicerol (ALVARENGA *et al.*, 2000; COTTORELLO e HENRY, 2002).

O uso combinado de crioprotetores tem sido recomendado por alguns autores (DALIMATIA e GRAHAM, 1997). Alguns açúcares mostraram ser capazes de evitar os danos causados pela desidratação através da estabilização da camada lipídica da membrana, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio (ANCHORDOGUY *et al.*, 1987).

Para alguns autores a adição de colesterol ou de lipossomas contendo colesterol no meio poderia aumentar a longevidade dos espermatozóides (WILHELM

*et al.*, 1996; CROSS, 1998), porém os resultados têm sido muito variáveis. A adição de plasma seminal ou de proteínas plasmáticas tem sido uma outra tentativa de melhorar a motilidade espermática ou a resistência do gameta ao choque osmótico após congelamento (FAGUNDES, 2003). Trabalhos como os de Braun *et al.* (1994) sugerem que a inclusão de até 20% de plasma seminal está associada com o aumento da motilidade, mas níveis maiores de 20% causam decréscimo da motilidade.

Quanto aos diluidores utilizados nas técnicas de congelamento, esses devem conter algum tipo de lipídio, lipoproteínas e nutrientes de forma a proteger os espermatozoides dos danos causados pelo choque térmico e manter o nível metabólico em valores compatíveis com a sua sobrevivência. Pode-se utilizar diluidores com gema de ovo ou uma combinação de gema de ovo e leite. Além de um crioprotetor permeante, como o glicerol ou uma combinação de glicerol e açúcares.

### **III. EFEITO DO CONGELAMENTO SOBRE A ESTRUTURA ESPERMÁTICA**

O grande desafio para a célula espermática no processo de criopreservação, não é a capacidade de resistir à temperatura de armazenamento de  $-196^{\circ}\text{C}$ , mas suportar as mudanças ocorridas na faixa crítica de formação de cristais de gelo, zona intermediária de temperatura, ( $-15$  a  $-60^{\circ}\text{C}$ ), na qual elas passam duas vezes, durante o congelamento e durante o descongelamento. Isto é difícil não só pela diversidade das estruturas espermáticas, as quais respondem de forma diferente ao congelamento, mas também por estarem expostas à ação de radicais de oxigênio durante as mudanças de temperatura (MAZUR, 1984).

Em diferentes espécies, aproximadamente 50% dos espermatozoides sobrevivem às condições do congelamento, medido por indicadores tais como motilidade e integridade de membrana. As membranas acrossomal e plasmática são mais sensíveis ao congelamento do que a membrana nuclear (SALAMON e MAXWELL, 2000). Mudanças bioquímicas, que incluem perda de lipoproteínas e

aminoácidos, aumento do sódio, diminuição do potássio, inativação de enzimas como a hialuronidase e acrosina, redução da atividade proteolítica acrossomal, diminuição da atividade de fosfatases, transaminases e desnaturação do DNA, têm sido descritas em espermatozoides criopreservados de bovinos, suínos, felinos, ovinos e humanos (SALAMON e MAXWELL, 1995). Esses compostos têm um papel chave na fertilização ou nos processos que lhe antecedem.

Em termos gerais considera-se sêmen de qualidade aquele que apresenta dois atributos: boa motilidade e baixa taxa de patologias espermáticas. Este tipo de análise, entretanto, é insuficiente uma vez que não avalia estruturas tais como membrana, acrossoma, cromatina, entre outras de importância na funcionalidade do espermatozoide (FELICIANO SILVA, 1998; UNANIAN, 2000).

### **III. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GERAL**

Analisar o efeito da criopreservação em algumas características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas de espermatozóides de *Equus caballus*.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Estudar o efeito da criopreservação sobre parâmetros convencionais dos espermogramas de rotina e na integridade de membranas;

Analisar o efeito da criopreservação na estabilidade da cromatina espermática;

Avaliar a integridade do DNA mediante o ensaio de desnaturação da cromatina espermática, laranja de acridina e citometria de fluxo (Sperm Chromatin Structure Assay - SCSA) em amostras resfriadas e criopreservadas;

Analisar o efeito da criopreservação no perfil eletroforético de proteínas espermáticas, obtidas de amostras in natura, diluídas e congeladas de sêmen eqüino;

Avaliar o efeito da criopreservação na atividade específica das enzimas  $\alpha$ -D-glucosidase e  $\alpha$ -D-manosidase.

## **IV. MATERIAIS E METODOS**

### **1. MATERIAIS**

Os reagentes utilizados foram obtidos de: Bio Rad (Hercules, CA, USA) [EDTA, acrilamida, persulfato de amônio, Temed, Tris, beta-mercaptoethanol, glicina, padrões de massa molecular conhecida para SDS-PAGE]; Sigma (St. Louis, MO, USA) [Bis Acrilamida, Azul de Bromofenol, Azul de Coomassie R-250, Azul Brilhante de Coomassie G, Triton X-100] Calbiochen (San Diego, CA, USA) [Dodecil Sulfato de Sódio, 4-methylumbelliferyl-alpha-D-glucopyranoside, 4-methylumbelliferyl-alpha-D-mannopyranoside]; Nutricell (Campinas, SP, Bra) [Equimix, FR-5, palheta 0.50]. Reagentes de uso geral como ácido clorídrico, glicerol, metanol, etanol, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, etc. foram obtidos de Merck (RJ, Bra) ou VETEC (RJ, Bra).

### **2. METODOLOGIAS:**

#### **2.1. OBTENÇÃO DE AMOSTRAS:**

No presente estudo se utilizou 14 garanhões entre 3 e 12 anos de idade, que apresentavam um bom estado sanitário e nutricional, pertencentes a Haras da região ou da Universidade Estadual Norte Fluminense. As amostras foram coletadas num período de um ano desde 23 de fevereiro de 2005 a 22 de fevereiro de 2006. Previamente à coleta das amostras, o médico veterinário responsável pelo estabelecimento realizou uma avaliação andrológica do animal. O sêmen foi obtido com o auxílio de uma vagina artificial modelo HANNOVER, cuja temperatura e pressão foram ajustadas de acordo com as características de cada animal. Nas coletas utilizou-se uma égua em cio para estimular o garanhão a realizar a monta.

## 2.2. ANÁLISE SEMINAL

Após a coleta e retirada da porção gelatinosa por filtração dos ejaculados, as amostras foram transportadas ao laboratório. Nas análises consideraram-se os seguintes parâmetros:

- **Volume:** A medida do volume foi feita, à temperatura ambiente, com o auxílio de uma proveta graduada.
- **Concentração dos gametas:** A concentração espermática das amostras de sêmen (diluído numa proporção 1:20 em H<sub>2</sub>O) foi determinada com o auxílio da câmara de Neubauer, sob microscópio óptico com aumento 400x.
- **Motilidade espermática:** A motilidade dos espermatozóides foi avaliada: a) após a coleta, b) após a diluição do sêmen em Equimix numa proporção 1:1 e c) após o descongelamento das amostras, com auxílio de um microscópio óptico, sob aumento de 400x, colocando-se uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula. A motilidade foi expressa em porcentagem de células móveis, pela avaliação de pelo menos 5 campos. Espermatozóides com motilidade progressiva foram aqueles que descreveram um deslocamento linear ou um círculo amplo, cujo raio excedeu o campo de visualização do microscópio.
- **Vigor:** O vigor do movimento dos espermatozóides foi classificado, com auxílio de um microscópio óptico (400x), em um ranking de 0 (ausente) a 5 (vigor máximo).
- **Teste hiposmótico (HOS):** Utilizou-se a técnica proposta por Dell'aqua Jr (2000), para avaliar a integridade funcional da membrana espermática. Foram avaliadas 100 células por amostra, com auxílio de um microscópio de contraste de fase (1000x).
- **Teste da estabilidade da cromatina:** Foram utilizados três procedimentos (indicados a seguir) e vários tempos de incubação:
  - 1- Dodecil sulfato de sódio - ditiotreitól (SDS-DTT) [0.5%SDS / 2mM DTT em 0.05M tampão borato pH9.0] (CALVIN E BEDFORD, 1971). Tempos de incubação: 10, 15, e 30 min.
  - 2- Tioglicolato de sódio alcalino [0.4M, pH9.0] (LEIVA, 1981). Tempos de incubação: 10, 20, e 30 min.

3- Dodecil sulfato de sódio – EDTA (SDS-EDTA) [0.5%SDS / 6mM EDTA] (KVIST, *et al.* 1990). Tempos de incubação: 15 e 30 min.

Nos três procedimentos a reação foi detida acrescentando glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,2M. Prepararam-se esfregaços, que foram fixados em metanol / ácido acético 3:1 (2 min.) e corados com a técnica de Papenheim (1976). Parte das amostras foi processada para análise no microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Na avaliação da morfologia e grau de descondensação se utilizaram como referencia os seguintes parâmetros pré-estabelecidos:

**Grupo I** ou espermatozoides estáveis: Células intensamente coradas, sem mudanças na configuração da cabeça espermática (tamanho da cabeça  $\leq 6.9 \mu\text{m}$ ). **Grupo II:** células parcialmente descondensadas (tamanho da cabeça  $>7.0$  to  $<7.9 \mu\text{m}$ ), **Grupo III:** região da cabeça do espermatozoide totalmente descondensado ( $\geq 8 \mu\text{m}$ ).

As medidas de cabeça espermática foram realizadas em um vídeo microscópio Axioplan Zeiss que conta com um programa computacional “Soft Imaging System Analysis<sup>R</sup>”. Foram avaliadas 100 células por amostra, com aumento de 1000x e calculou-se a porcentagem de núcleos estáveis, parcial e grosseiramente descondensados em cada grupo de amostras.

### 2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à estatística descritiva (médias, desvio padrão) e análise de variância utilizando o programa computacional Excel versão 4.5. Na análise de variância foi adotado o nível de 5% de significância para todos os parâmetros avaliados no experimento. Para interação não significativa entre os fatores, as médias dos níveis de cada fator foram comparadas pelo teste *t* independente dos níveis do outro fator.



## 2.4. DILUIÇÃO E CONGELAMENTO DO SÊMEN

Neste estudo se utilizaram amostras in natura, diluídas na proporção 1:1 em meio Equimix (Nutricell, SP-Br) e amostras congeladas segundo o procedimento recomendado por Papa *et al.* (2002).

Os espermatozoides foram obtidos por centrifugação do sêmen (1600xg durante 10 min). Ao pellet de espermatozoides acrescentou-se o meio de congelamento FR5 de modo a obter uma concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides / mL. As amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL, as quais foram vedadas numa extremidade com álcool polivinílico e identificadas com o nome do garanhão e data de congelamento. As palhetas foram mantidas por 1h a 5 °C e logo colocadas sobre um suporte metálico dentro de uma câmara de congelamento, 4cm acima do nível de nitrogênio líquido. Após a estabilização no vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos, as palhetas foram mergulhadas no N<sub>2</sub> líquido e transferidas com o auxílio de uma pinça para um botijão contendo N<sub>2</sub> líquido a - 196°C (PAPA *et al.*, 2002).

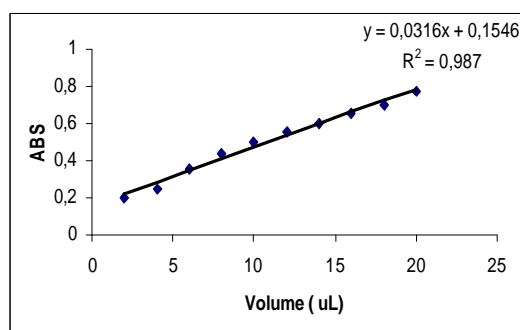
As palhetas com sêmen congelado permaneceram no nitrogênio líquido durante diferentes períodos de tempo (entre 2h e 60 dias). Após um período estabelecido, foram descongeladas em banho-maria a 46 °C por 20 segundos, (DELL'AQUA JR, 2000). Em seguida, as palhetas foram seccionadas numa das suas extremidades, coletando-se as amostras necessárias para realizar o espermiograma de rotina, ensaios de estabilidade da cromatina, detecção da atividade da manosidase e glucosidase e análise do perfil eletroforético de amostras in natura, diluídas e congeladas.

## 2.5. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

Os espermatozoides foram lavados em PBS pH 7.0, sonicados em um equipamento Sonic Dismembrator 60 (Fisher Scientific) de alta intensidade (20 W) durante 3 min [6 ciclos de 30 segundos cada] e centrifugadas a 17000xg (4 °C) por 30 min (RETAMAL *et al.*, 1999). Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C para

posterior análise eletroforética ou fluorimétrica. Uma alíquota de cada amostra foi retirada para dosagem de proteínas totais.

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford, (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. As amostras foram ensaiadas com as concentrações de BSA variando de 0 a 25 µg/mL, com intervalos de 5 µg. As leituras foram realizadas em um leitor de Elisa, a 595 nm de comprimento de onda ou em um espectrofotômetro modelo 600 plus marca Femto.



**Fig. 1:** Curva Padrão de BSA para determinação da concentração relativa das proteínas.

## 2.6. DETECÇÃO DE ATIVIDADE GLICOSIDÁSICA EM PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS

A atividade glicosidásica dos espermatozóides foi determinada fluorimetricamente utilizando 4-metilumbeliferil  $\alpha$ -D-manopiranosídeo 2 mM, como substrato da manosidase, e 4 – metilumbeliferil  $\alpha$ -D-glucosídeo 2 mM para glucosidase. Ambos os substratos foram diluídos em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,0 (10 µL de amostra, 4 µL de substrato e 6 µL de tampão). As amostras foram incubadas com os substratos correspondentes por 1h a 37 °C. A reação foi detida com 300 µL do tampão glicina / NaOH 2 M, pH 10,8. A 100 µL desta solução foi adicionada água mili-Q até completar 2 ml para realizar a leitura. A fluorescência emitida pelo produto da hidrólise do substrato [4-metilumbeliferona (4-MU)] foi medida em espectrofotômetro F 4500 (Hitachi), utilizando 360 nm de comprimento de onda de excitação e 460 nm de emissão. A intensidade de fluorescência foi convertida e µmoles de 4-MU liberados, por minuto, a 37 °C, pela interpolação com

uma curva de calibração (0 a 200  $\mu$ moles) de 4-metilumbiliferona. Uma unidade de enzima foi definida como a atividade que liberou 1  $\mu$ mol de produto (4-MU) por minuto, a 37 °C. Os valores do branco foram subtraídos da média dos valores (obtidos em duplicata) das amostras analisadas.

## **2.7. ANÁLISE ELETROFORÉTICA DE PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS**

As proteínas espermáticas foram submetidas à eletroforese unidimensional em minigéis de poliacrilamida (PAGE) em condições nativas (6%) (DAVIS, 1964) e desnaturantes (12% SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970), sendo reveladas com azul brilhante de Coomassie R-250 para proteínas (REISNER, 1984), PAS para glicoproteínas (GANDER, 1984). Todas as amostras foram diluídas com uma solução salina contendo NaCl 50mM,  $K_2HPO_4$  1mM (1:1), no intuito de melhorar a resolução das bandas do gel. Para análise do perfil protéico utilizou-se o programa computacional Gel Perfect (BOZZO E RETAMAL, 1991).

Para a detecção da atividade glicosidásica das proteínas espermáticas. Foram realizadas eletroforeses gradiente de poro transversal (RETAMAL e BABUL, 1988) para a padronização da técnica (plasma seminal foi utilizado como controle). As proteínas foram submetidas a géis em condições nativas e desnaturantes. Após a migração eletroforética, os géis foram lavados em água destilada por três vezes e transferidos para uma solução de Triton x-100 2,5%, por 30 min. Logo foram lavadas em água destilada e incubadas com tampão fosfato 0,2M pH 6,0 (15 min), sobre o gel foi espalhada uma fina camada de tampão fosfato 0,2M, pH 6,0 (200 $\mu$ L) contendo 7,5 $\mu$ L do substrato -4MU. A incubação foi realizada a 37 °C durante 1h, ao abrigo de luz. Os géis foram colocados sobre um transluminador de ultravioleta e após fotografar a reação fluorescente das bandas com atividade enzimática os géis foram corados com azul de coomassie R-250 0,1%, fotografados e as imagens guardadas como formato TIFF foram sobrepostas uma a outra.

## 2.8. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA

As massas moleculares relativas das proteínas foram calculadas por comparação da sua mobilidade eletroforética com proteínas de massa molecular conhecida, que co-migraram no mesmo gel. A quantidade relativa das diversas proteínas foi determinada por densitometria, usando o programa Gel Perfect (BOZZO e RETAMAL,1991), a partir de imagem dos géis no formato TIFF obtidas em um scanner comercial em 400 dpi. O programa calcula a mobilidade relativa (Rf) de cada banda e a área ocupada por ela, dando também uma representação diagramática das bandas protéicas e sua concentração relativa em relação ao total de proteínas por canal.

## 2.9. TESTE DE ESTABILIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA)

Em algumas amostras aplicou-se este procedimento desenvolvido por Evenson *et al.*,(1989) no intuito de medir a desnaturabilidade do DNA espermático *in vitro*. Esta metodologia utiliza o corante laranja de acridina (AO) para quantificar a porcentagem de DNA de dupla fita e fita simples após desnaturação ácida ou por calor (EVENSON *et al.*, 1980; EVENSON *et al.*, 1995). A metodologia inclui a lavagem dos espermatozóides em PBS pH 7.2, centrifugação (760xg por 10 min) e ressuspensão do precipitado em 200 µL de tampão TNE, pH 7,4 que contém NaCl 0,15M; Tris 0,01M; EDTA 1mM. Incubaram-se 100µL da amostra em 200µL de solução desnaturante (Triton X-100 0.1%, HCl 0,08N, NaCl 0,15M, pH 1,2) por 30 segundos. Após a incubação, adicionou-se 600µL da solução com laranja de acridina [(6,0µg de laranja de acridina/ mL de solução stock (370 mL de ácido cítrico 0,1M + 630mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M, EDTA 1 mM, NaCl 0.15M)] pH 6,0. As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% e tampão fosfato 0,2 M e logo analisadas em um citômetro de fluxo Elite/ESP Coulter. Como controle as amostras foram incubadas em solução não desnaturante (Triton X-100 0,1%, NaCl 0,15M) por 30 segundos e fixadas com a mesma solução descrita acima. A leitura de emissão da fluorescência verde foi realizada em um sistema de filtros DL500 e

BP525nm e a leitura de emissão de fluorescência vermelha em um filtro BP675nm, com conseqüente amplificação de sinal através de fotomultiplicadores individuais, após excitação dos fluorocromos com laser de 488nm. Os dados foram expressos em dispersão bivariativa de 10000 eventos. O histograma da distribuição de fluorescência verde e vermelha foi obtido pelo programa WinMDI 2.8.

## V. RESULTADOS

### I. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS

Nossos resultados mostraram que após a diluição das amostras houve um aumento relativo na motilidade espermática (~10 – 20%), porém o vigor não sofreu variações significativas. Este resultado confirma análises prévias realizadas no laboratório, que indicaram que amostras diluídas de sêmen (quer seja na proporção 1:1 ou 1:2) preservam melhor a motilidade espermática, quando comparadas com aquelas mantidas sem diluente. A diluição não só inibe a aglutinação dos espermatozóides, mas preserva também a motilidade e vigor das células espermáticas. A época da coleta não alterou significativamente a média de espermatozóides com motilidade progressiva nos animais estudados. Isto é, mesmo sendo os eqüinos reprodutores estacionais (a égua é poliéstrica estacional) o garanhão não apresenta ciclicidade na produção de espermatozóides e a percentagem de espermatozóides com motilidade progressiva não mostrou flutuações estacionais.

Nosso resultado mostra que a criopreservação modifica, em maior ou em menor grau, as características seminais avaliadas nos espermiogramas de rotina. Após o congelamento e descongelamento das amostras, a motilidade diminui de forma significativa. Como se observa na Tabela I após 7 e 30 dias de congelamento a média de espermatozóides com motilidade progressiva cai de 76% a 37,3% e 34% respectivamente no primeiro grupo de animais (n=9). Já no segundo grupo (n=5) a média de espermatozóides com motilidade progressiva após 7 dias de congelamento é menor que 10%. A motilidade média dos 14 animais estudados foi 76,5% versus 26,4% e 25,8 após 7 e 30 dias de congelamento respectivamente. A diferença nos resultados obtidos pode ser devido aos animais do primeiro grupo ter antecedentes de serem potencialmente bons reprodutores; entretanto no segundo grupo a coleta foi realizada em animais selecionados ao acaso.

Cabe destacar a grande variabilidade quanto à susceptibilidade dos gametas ao processo de criopreservação, entre animais, inclusive entre ejaculados de um

mesmo animal. Assim, no primeiro grupo 5 dos 9 animais estudados apresentaram 30 a 60% de motilidade progressiva pós-descongelamento (valores recomendados internacionalmente para procedimentos de inseminação artificial). Entretanto, 3 animais apresentaram 20 - 29% de espermatozóides com motilidade progressiva após a criopreservação e um garanhão apresentou escassos espermatozóides móveis. Já no segundo grupo de 5 animais, a percentagem de motilidade progressiva ficou entre um 2 e 15%. Tomando em conjunto os 14 animais analisados, foi possível verificar que 36% dos reprodutores poderiam ser classificados como de boa congelabilidade, 21% de moderada congelabilidade e 43% de baixa congelabilidade ( $\leq 15\%$  de motilidade progressiva após a criopreservação).

Quanto ao vigor, que representa a força do movimento da célula espermática, também foi observada uma redução dos valores obtidos nas amostras congeladas, comparadas com as amostras *in natura* e diluídas. Os animais que apresentaram boa congelabilidade apresentaram vigor entre 3 e 4 nas amostras diluídas e entre 2 e 3 após 24h de congelamento, mantendo-se este valor até após 30 dias de congelamento. Animais classificados como de moderada congelabilidade, apresentaram vigor 3 nas amostras resfriadas, e de 1-2 nas amostras congeladas. Nos animais que apresentaram baixa percentagem de células com motilidade progressiva após criopreservação, o vigor também diminuiu de 3-4 para 1-2 pós-descongelamento.

A figura 2 mostra a motilidade progressiva das amostras estudadas após diferentes tempos de congelamento (2, 24, 48 e 72 horas, 5, 7, 15, 21, 30 e 60 dias). Como se observa nesta figura a motilidade progressiva média diminuiu de forma significativa ( $p < 0.05$ ) logo após o congelamento das amostras. Uma resposta relativamente similar obteve-se ao avaliar o vigor do movimento flagelar e a integridade da membrana determinada pelo teste hiposmótico (HOS).

TABELA I

**RESUMO DE VALORES OBTIDOS NOS ESPERMIOGRAMAS DE ROTINA  
ANTES E APÓS O CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO DAS AMOSTRAS**

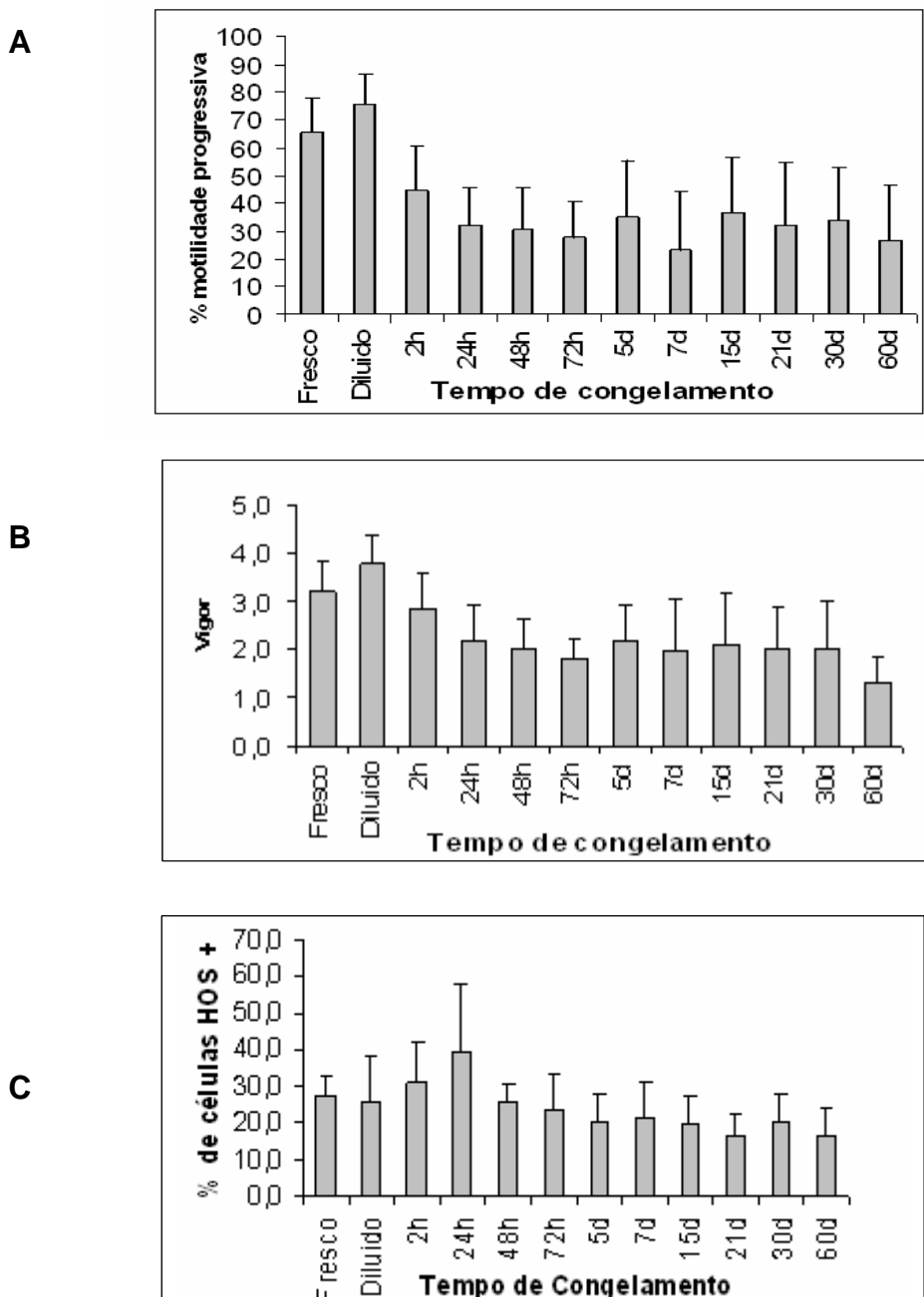
| Antes do congelamento |        |       |         |       |                       |        |       |      |     | Pós-congelamento<br>7 dias |       |      | 30 d |
|-----------------------|--------|-------|---------|-------|-----------------------|--------|-------|------|-----|----------------------------|-------|------|------|
| Data                  | Animal | Idade | Vol. ml | Vigor | [ ] x 10 <sup>6</sup> | Mot. F | Mot.D | Pat. | pH  | Mot. P                     | Vigor | Pat. | Mot  |
| 23/02                 | 1      | 6     | 40      | 4     | 160                   | 85     | 93    | 20   | 8   | 63                         | 3     | 23   | 60   |
| 27/02                 | 2      | 3     | 10      | 4     | 1425                  | 54     | 88    | 23   | 8   | 50                         | 2     | 27   | 55   |
| 01/03                 | 3      | 9     | 35      | 4     | 200                   | 85     | 62    | 20   | 8   | 5                          | 1     | 25   | 1    |
| 14/06                 | 4      | 6     | 12,5    | 3     | 225                   | 50     | 60    | 20   | 7   | 35                         | 1     | 23   | 20   |
| 14/06                 | 5      | 5     | 15,5    | 3     | 400                   | 60     | 75    | 15   | 7   | 30                         | 1     | 16   | 20   |
| 17/08                 | 6      | 6     | 50      | 3     | 155                   | 60     | 70    | 9    | 7,5 | 33                         | 2     | 10   | 29   |
| 30/09                 | 7      | 6     | 50      | 4,5   | 115                   | 65     | 80    | 6    | 7,5 | 50                         | 3,5   | 8    | 50   |
| 18/10                 | 8      | 4     | 52      | 4     | 105                   | 60     | 75    | 8    | 7,5 | 40                         | 3     | 17   | 40   |
| 19/10                 | 9      | 8     | 25      | 4,5   | 145                   | 70     | 80    | 11   | 7,7 | 30                         | 3     | 15   | 30   |
| 26/01                 | 10     | 3     | 35      | 4     | 110                   | 80     | 90    | 7    | 7,5 | 4                          | 2     | 8    | 1    |
| 16/02                 | 11     | 7     | 25      | 4     | 65                    | 70     | 70    | 8    | 7   | 6                          | 2,5   | 15   | 5    |
| 16/02                 | 12     | 8     | 30      | 4     | 70                    | 60     | 60    | 11   | 7,5 | 2                          | 2     | 13   | 10   |
| 22/02                 | 13     | 12    | 50      | 3     | 70                    | 70     | 80    | 6    | 8   | 15                         | 2     | 11   | 15   |
| 22/02                 | 14     | 11    | 50      | 4,5   | 50                    | 70     | 85    | 12   | 8   | 10                         | 2,5   | 9    | 25   |
| Média                 |        |       | 33,4    | 3,5   | 220,9                 | 65,6   | 76,5  | 12,6 | 7,6 | 26,4                       | 2,0   | 15   | 25,8 |
| DP                    |        |       | 14,9    | 0,6   | 331,9                 | 11,0   | 10,8  | 5,7  | 0,4 | 19,6                       | 1,1   | 6    | 19,1 |

Mot. F: motilidade no sêmen *in natura*; Mot. D: motilidade no sêmen diluído; Pat.: % de patologias (totais)

**Nota:** Como se observa na Tabela I a maioria dos animais coletados podem ser classificados como potencialmente férteis, conforme os parâmetros estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal que recomenda utilizar para inseminação artificial (IA) amostras com uma motilidade progressiva > 70%, vigor > 3 e patologia espermáticas < 30%.



**MOTILIDADE PROGRESSIVA, VIGOR E RESPOSTA A TESTE HOS  
PÓS - CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO DAS AMOSTRAS DE SÊMEN  
EQUINO**



**Fig. 2** - Gráficos que mostram motilidade progressiva média (A); vigor (B) e integridade de membrana medida pelo teste de HOS (C) de células espermáticas de *E. caballus*, em amostras frescas (*in natura*), diluídas e criopreservadas por períodos entre 2 horas e 60 dias. A diferença entre os valores (motilidade progressiva e HOS) de amostras frescas *-in natura-* (diluídas ou não) e congeladas são significativas ( $p < 0.05$ ).

## II. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A ESTABILIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA

Os experimentos preliminares, visando padronizar os testes de descondensação da cromatina aplicados neste estudo, mostraram que a metodologia de preparo das amostras, como diluição e temperatura de transporte, não influenciaram o resultado dos testes de estabilidade nuclear. (SDS-DTT; SDS-EDTA e Tioglicolato alcalino). Como se observa na figura 3, espermatozóides maduros, provenientes de amostras *in natura* e de amostras previamente refrigeradas (diluídas ou não diluídas), foram igualmente resistentes ao teste de descondensação utilizados neste trabalho, apresentando menos de 10% de espermatozóides descondensados. Cabe assinalar que as amostras foram obtidas de animais com espermiogramas compatíveis com fertilidade potencial. Segundo a literatura, as células maduras provenientes de homens férteis apresentam uma cromatina estável. Já nos indivíduos inférteis a porcentagem de descondensação nuclear frente a agentes redutores é superior a 30%, alcançando valores de até 65%.

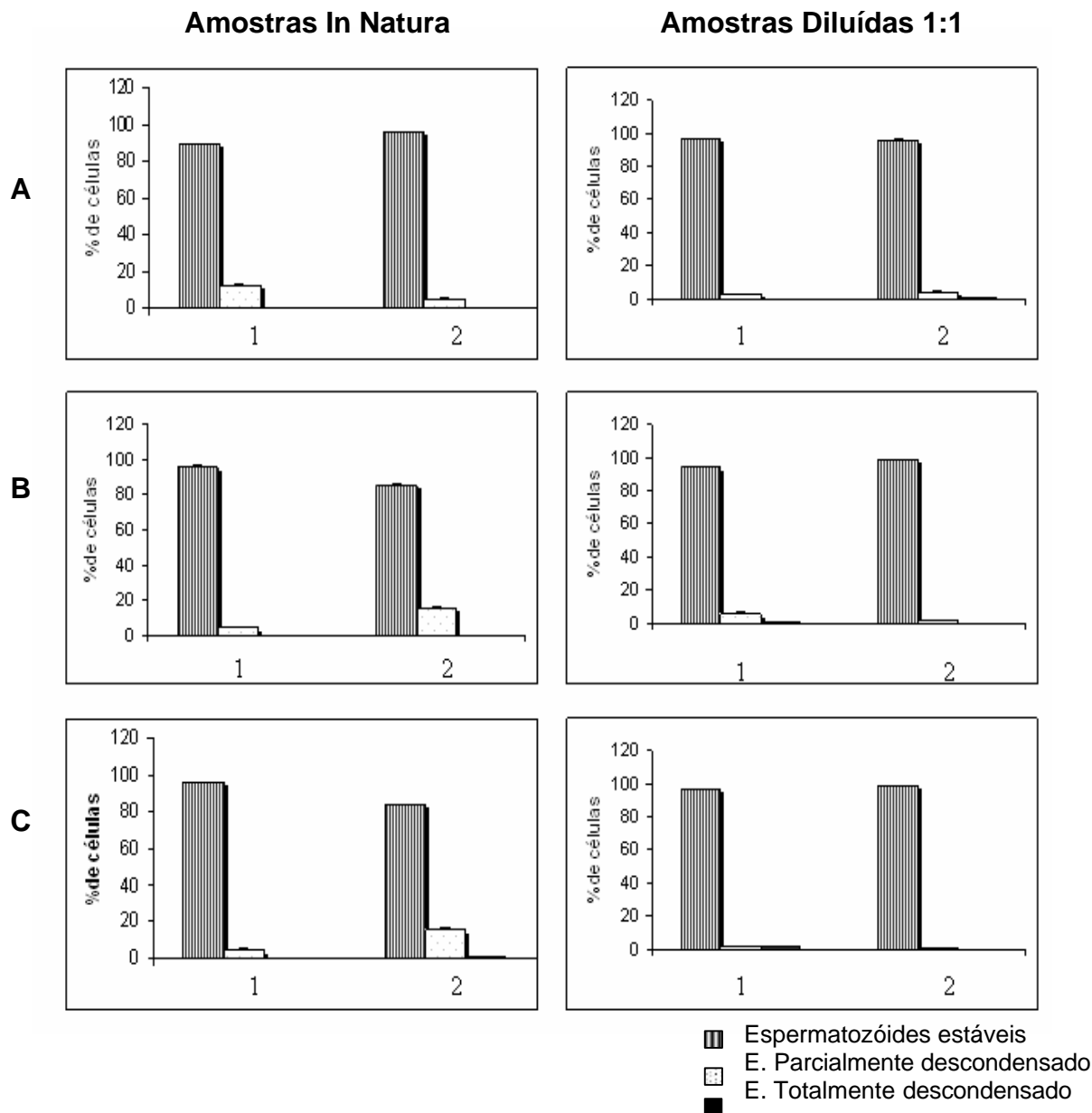
Após congelamento / descongelamento das amostras os resultados foram relativamente similares. Como se observa na figura 4, independentemente do tempo que os espermatozóides estiveram expostos às baixas temperaturas do procedimento de criopreservação, a estabilidade do núcleo espermático parece não ser afetada. A análise microscópica das amostras (a nível óptico e eletrônico – MEV) permitiu verificar um predomínio das células com morfologia normal (forma e tamanho da cabeça espermática), mesmo após o tratamento com agentes redutores. Uma subpopulação menor, cuja porcentagem variou segundo os tempos de incubação e qualidade das amostras, mostrou diversos graus de descondensação nuclear após tratamento com agentes redutores. Neste grupo de células se observou um aumento do volume da cabeça, cabeças separadas do flagelo e perda da integridade da membrana plasmática.

A figura 5 mostra cabeças espermáticas de células estáveis, parcialmente descondensadas e totalmente descondensadas por efeito dos agentes redutores de RS-SR, utilizados nos testes de descondensação. Como se observa na análise

densitométrica dos espermatozóides totalmente descondensados, a imagem desaparece rapidamente à medida que passa o filtro óptico. Enquanto a imagem do espermatozóide não descondensado (estável) permanece um tempo maior ao passar pelo filtro óptico. Estes dados sugerem que os espermatozóides totalmente descondensados sofreram danos na sua cromatina, liberando o material celular tornando-se menos refringentes, enquanto os estáveis mostram-se totalmente refringentes.

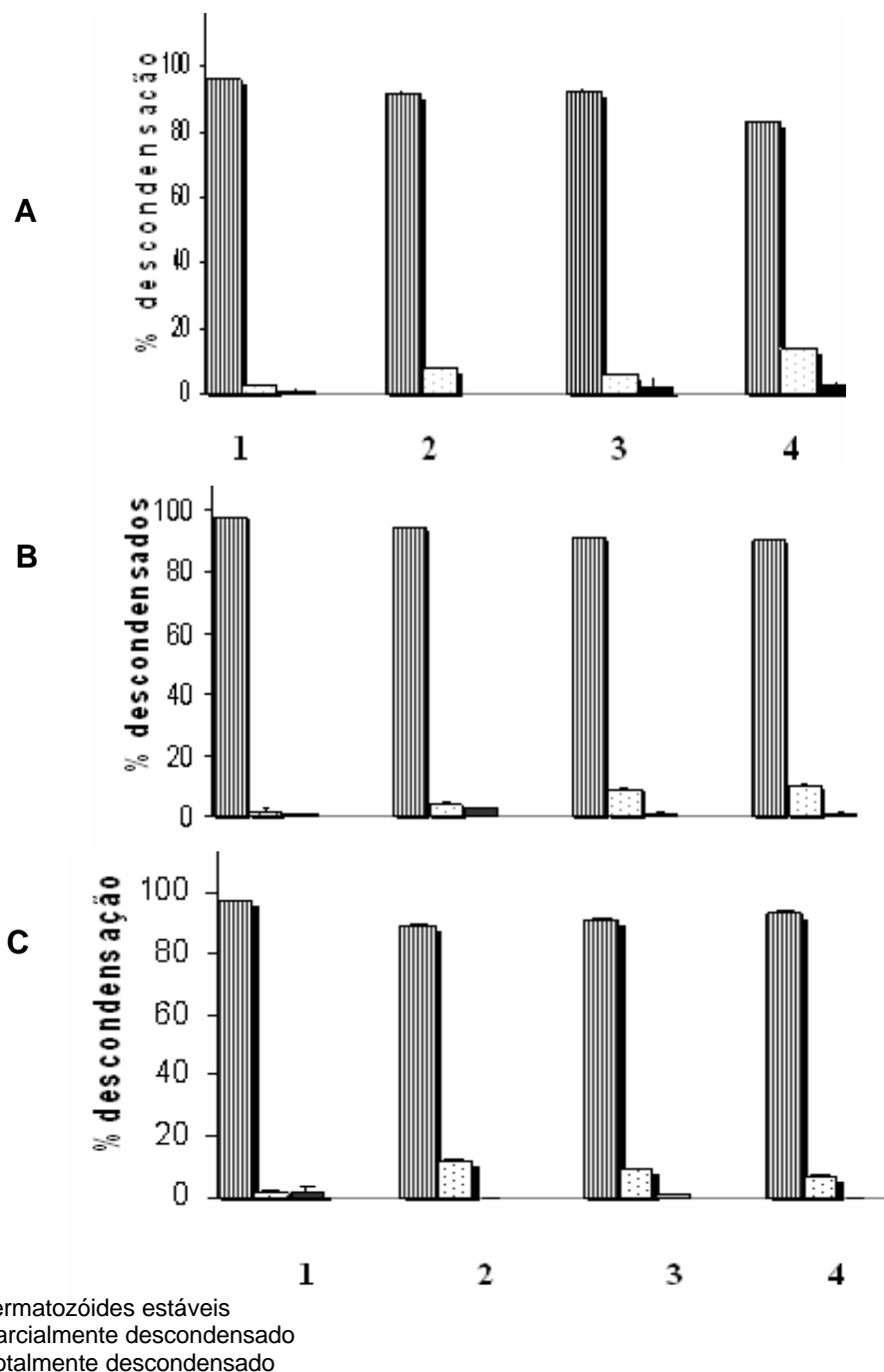
Após a criopreservação uma porcentagem dos espermatozóides apresentou alterações morfológicas da cabeça espermática, ruptura da membrana plasmática e acrossomal, separação da cabeça do flagelo, alterações ao nível da peça de conexão. Como se observa nas figuras 6 e 7, sendo a primeira de amostras frescas (*in natura*) e criopreservadas sem tratamento com agentes redutores e a segunda amostras resfriadas e criopreservadas com tratamento com SDS-DTT, SDS-EDTA e Tioglicolato alcalino.

**ESTABILIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA**  
**TESTES TIOLGLICOLATO ALCALINO (A); SDS - EDTA (B); SDS – DTT (C)**  
**[amostras resfriadas e sem resfriar (*in natura* / diluídas)]**



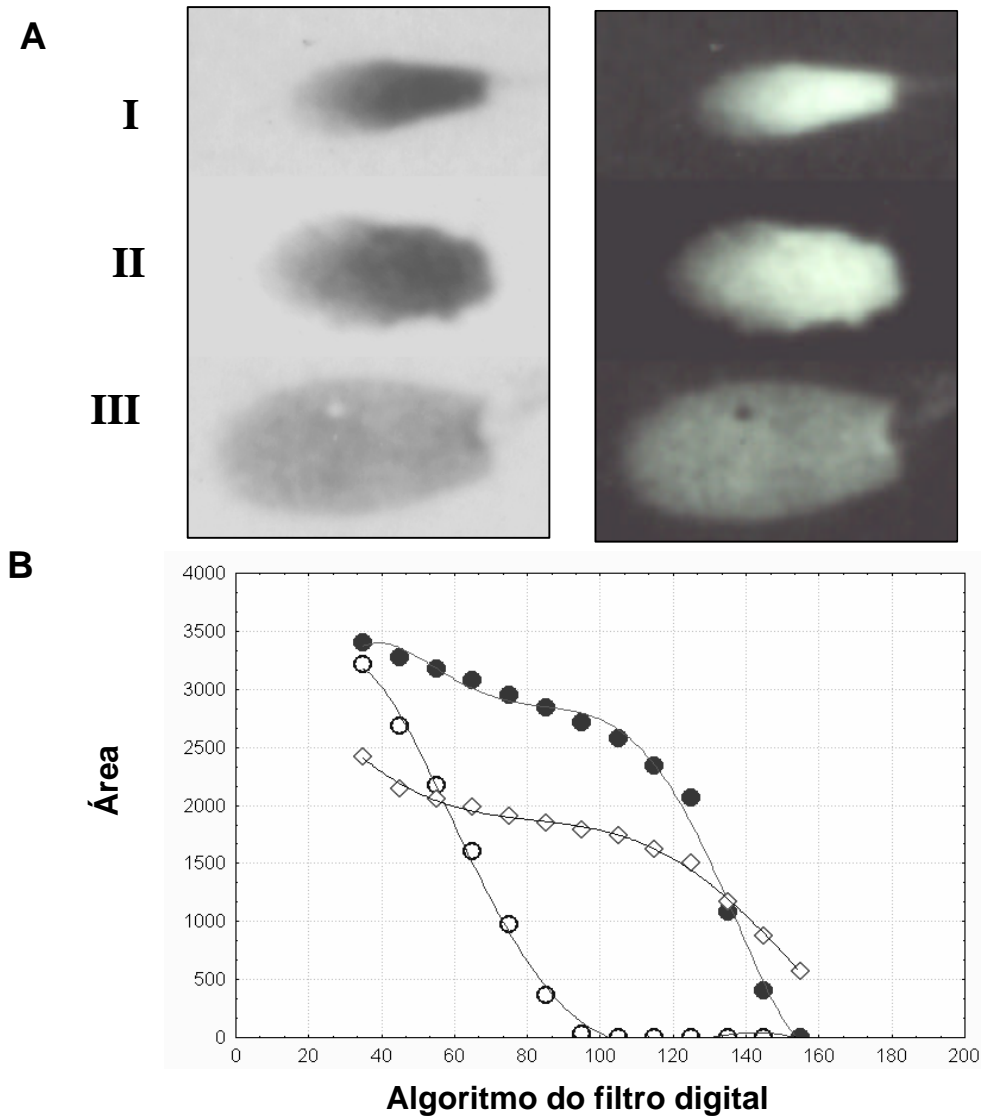
**Fig. 3** - O gráfico representa a porcentagem de espermatozoides estáveis, parcialmente descondensados e totalmente descondensados em amostras resfriadas (grupo 1) e amostras sem resfriar (grupo 2). Tratamentos: A) tioglicolato alcalino; B) SDS-EDTA; C) SDS-DTT

**ESTABILIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA**  
**TESTES TIOGLICOLATO ALCALINO (A); SDS - EDTA (B); SDS – DTT (C)**  
**[amostras resfriadas e congeladas]**



**Fig. 4** - O gráfico representa a porcentagem de espermatozoides estáveis, parcialmente descondensados e totalmente descondensados em amostras *in natura* / diluídas (1) e criopreservadas (2, 3 e 4) Amostras criopreservadas durante 7 dias (2), 15 dias (3) e 30 dias (4). Testes: Tioglicolato (A); SDS-EDTA (B); SDS-DTT (C).

## FOTOMICROGRAFIA DE CABEÇAS ESPERMÁTICAS

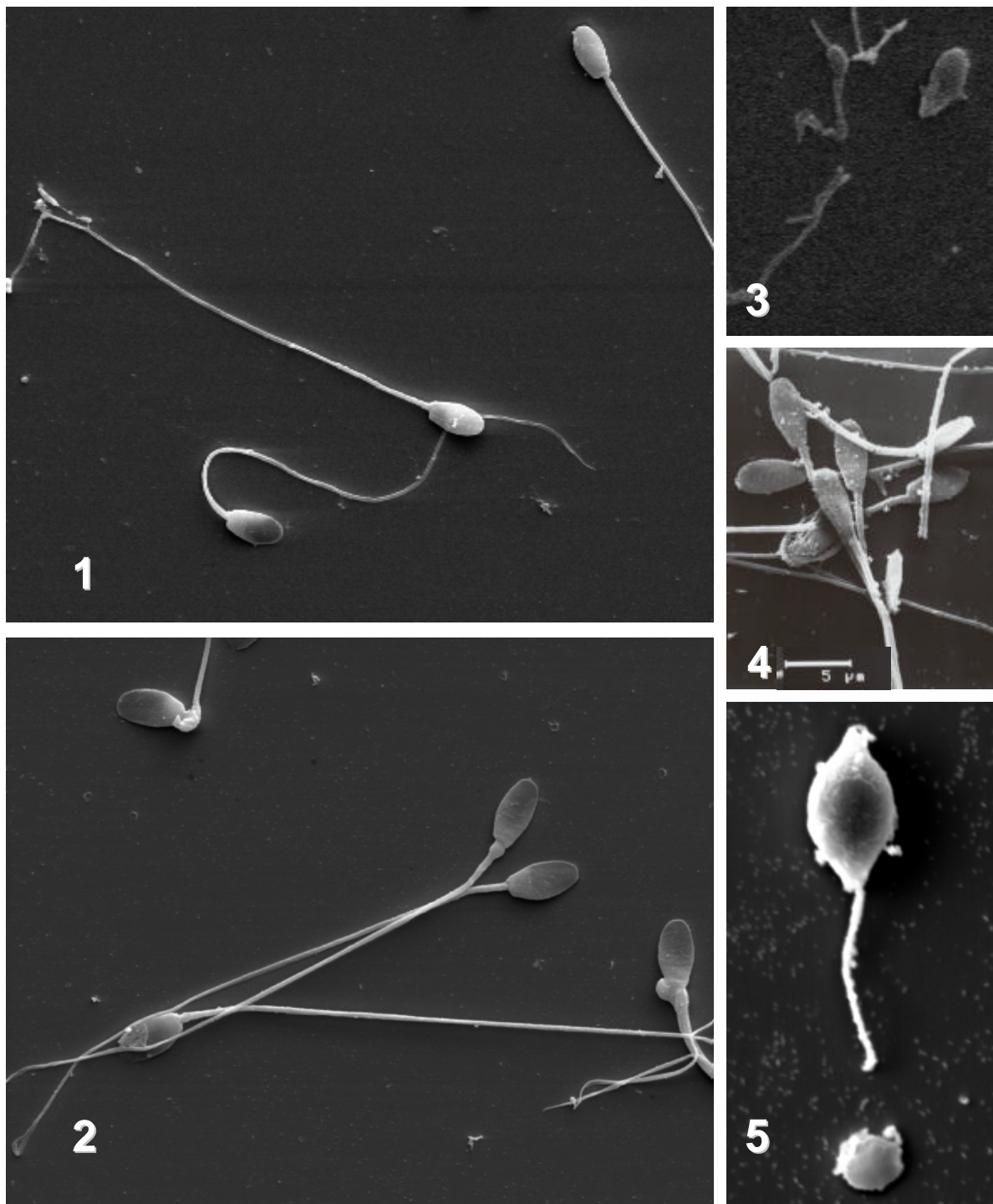


**Fig. 5:** A Fotomicrografias de cabeças espermáticas (microscopia de campo claro, 1000x) após tratamento com agentes redutores de RS-SR e B a correspondente análise das imagens pelo programa de densitometria óptica de Bozzo e Retamal, (1991).

Imagens de espermatozoides classificados como: I estáveis, II parcialmente descondensados e III totalmente descondensados.

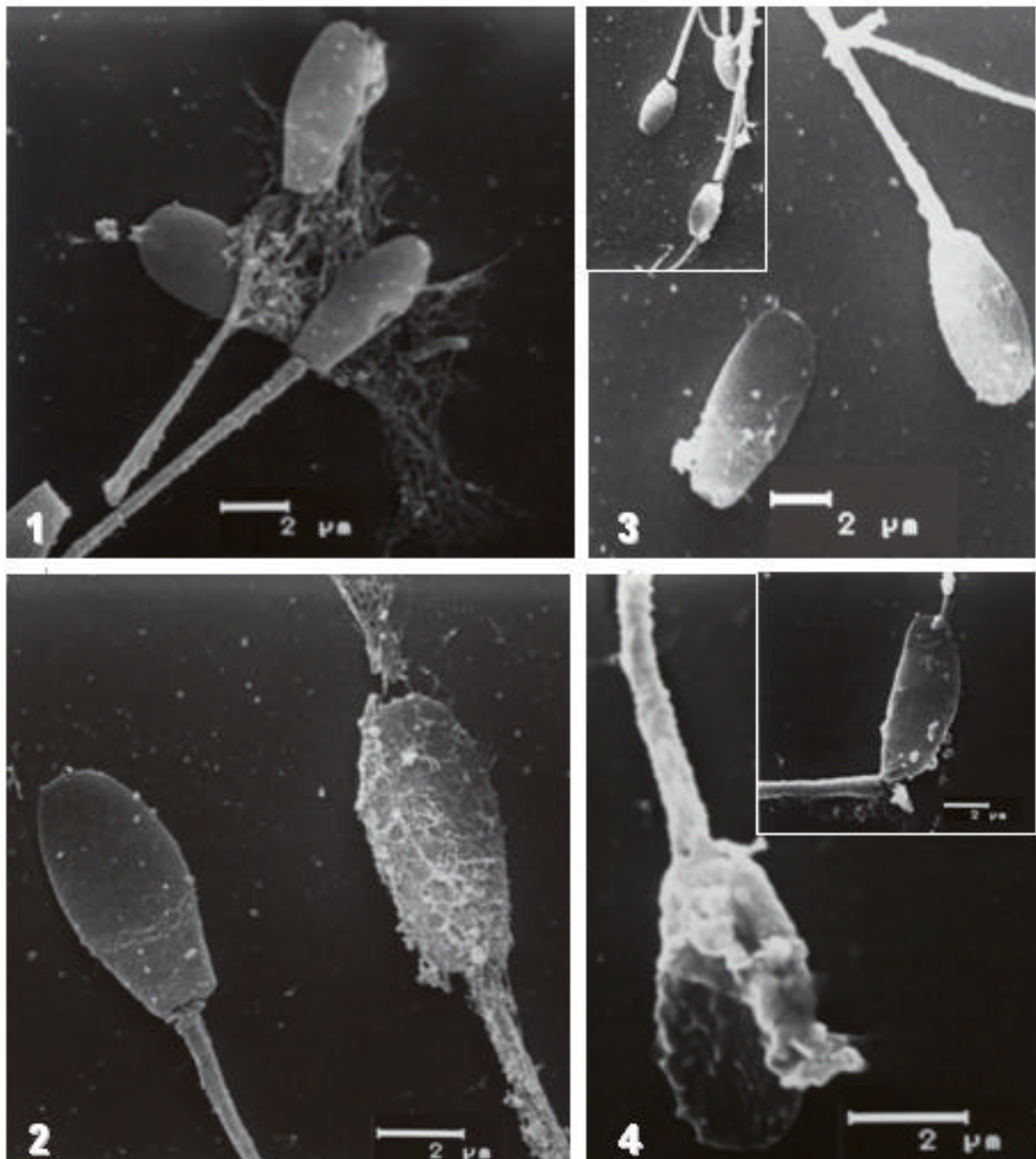
□ Estáveis; ● Parcialmente descondensado; ○ Totalmente descondensados.

## EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA



**Fig. 6** - Microfotografias (MEV) de espermatozoides eqüinos. Amostras *in natura* (1) e criopreservadas (2, 3, 4, 5).

## EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA ESTABILIDADE NUCLEAR



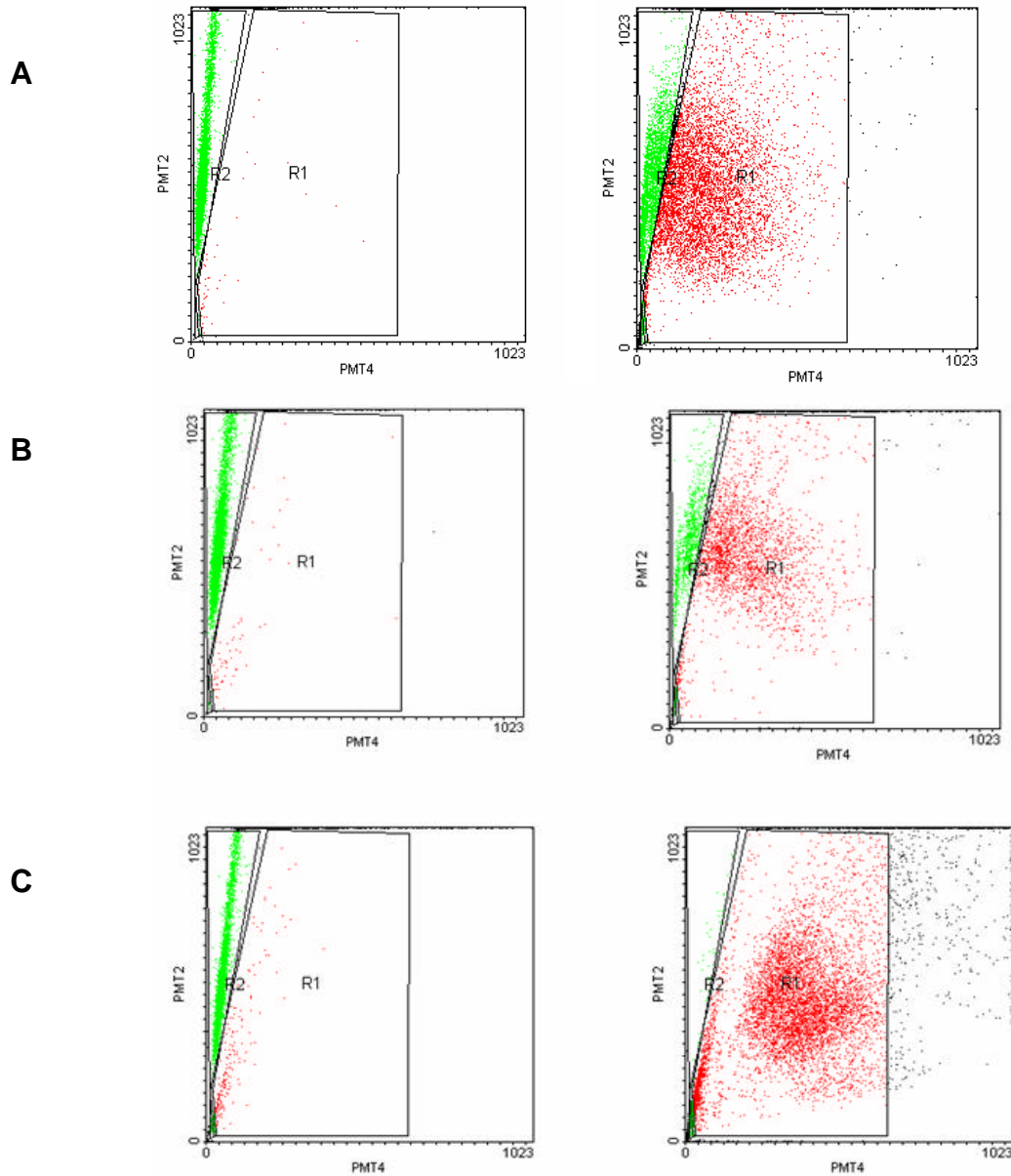
**Fig. 7** - Microfotografias (MEV) de espermatozóides eqüinos. Amostras resfriadas (1, 2) tratadas com SDS - EDTA e congeladas (3, 4), tratadas com SDS - DTT (3) e com tioglicolato alcalino (4)



### III. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A INTEGRIDADE DO DNA

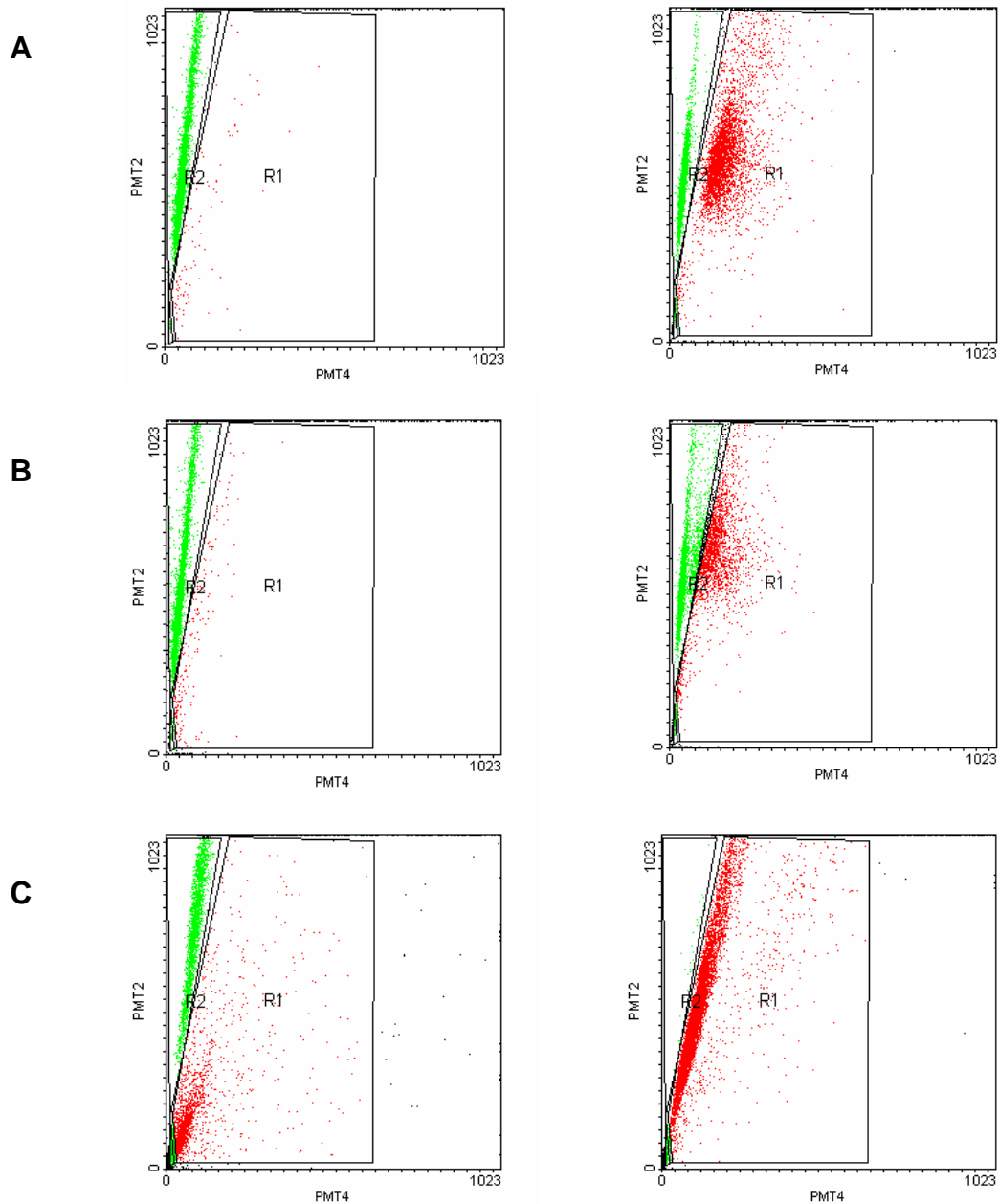
Os resultados obtidos com a técnica SCSA, que utiliza laranja de acridina (AO) para quantificar, por citometria de fluxo, a percentagem de células com DNA de dupla fita e fita simples, após desnaturação ácida ou por calor, mostraram uma percentagem importante de células afetadas pelo tratamento após 30 dias de congelamento / descongelamento das amostras (figura 8, 9, 10). No entanto, é importante ressaltar que essa percentagem também foi elevada nas amostras *in natura*. Porém, a diluição parece proteger parcialmente as células espermáticas contra a crioinjúria. Os espermatozoides demonstraram uma grande variação quanto à susceptibilidade do DNA à desnaturação *in situ*. A percentagem de células em amostras individuais mostrando DNA desnaturado variou entre 4-60% após congelamento / descongelamento das amostras. Entretanto, quando as células foram observadas no microscópio de fluorescência verificou-se que a grande maioria dos espermatozoides emitia fluorescência verde, que indica a união do corante ao DNA de fita dupla. Uma percentagem menor de células exibiu fluorescência alaranjada, e alguns espermatozoides pareciam emitir em ambos os comprimentos de onda. Algumas células somáticas, possivelmente descamadas do trato reprodutivo emitiram uma forte fluorescência vermelho-alaranjada, produto da união do fluorocromo ao RNA citoplasmático (figura 11). Provavelmente o congelamento afete majoritariamente os gametas imaturos ou previamente danificados. Porém, existe a possibilidade que os procedimentos prévios ao congelamento tenham danificado uma percentagem importante de células.

## ESTABILIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA) [amostras *in natura*, diluídas e congeladas]



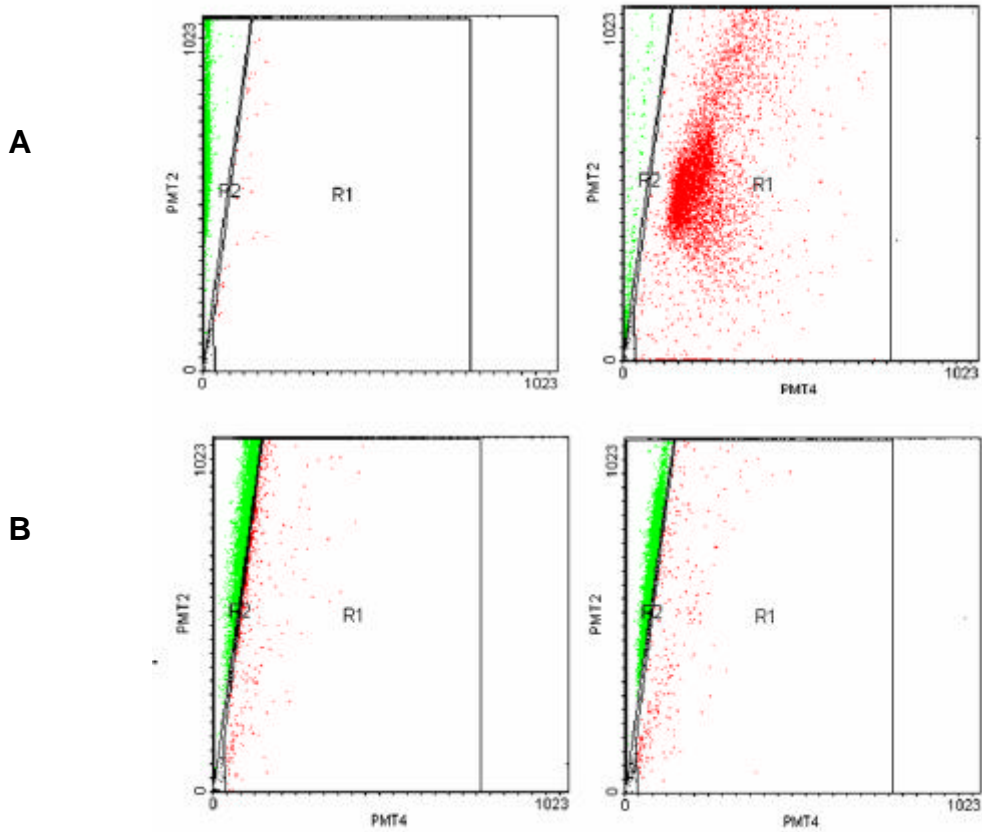
**Fig. 8** - (Dispersão) Distribuição da população de células que apresentam fluorescência verde e vermelha após SCSA e citometria de fluxo. Amostra *in natura* (A), amostra *in natura* / diluída (B) e amostra congelada (C). A coluna da esquerda as amostras sem tratamento ácido e a coluna da direita corresponde a amostras com tratamento ácido. Estes resultados correspondem a um animal que congelou mal.

## ESTABILIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA) [amostras *in natura*, diluídas e congeladas]



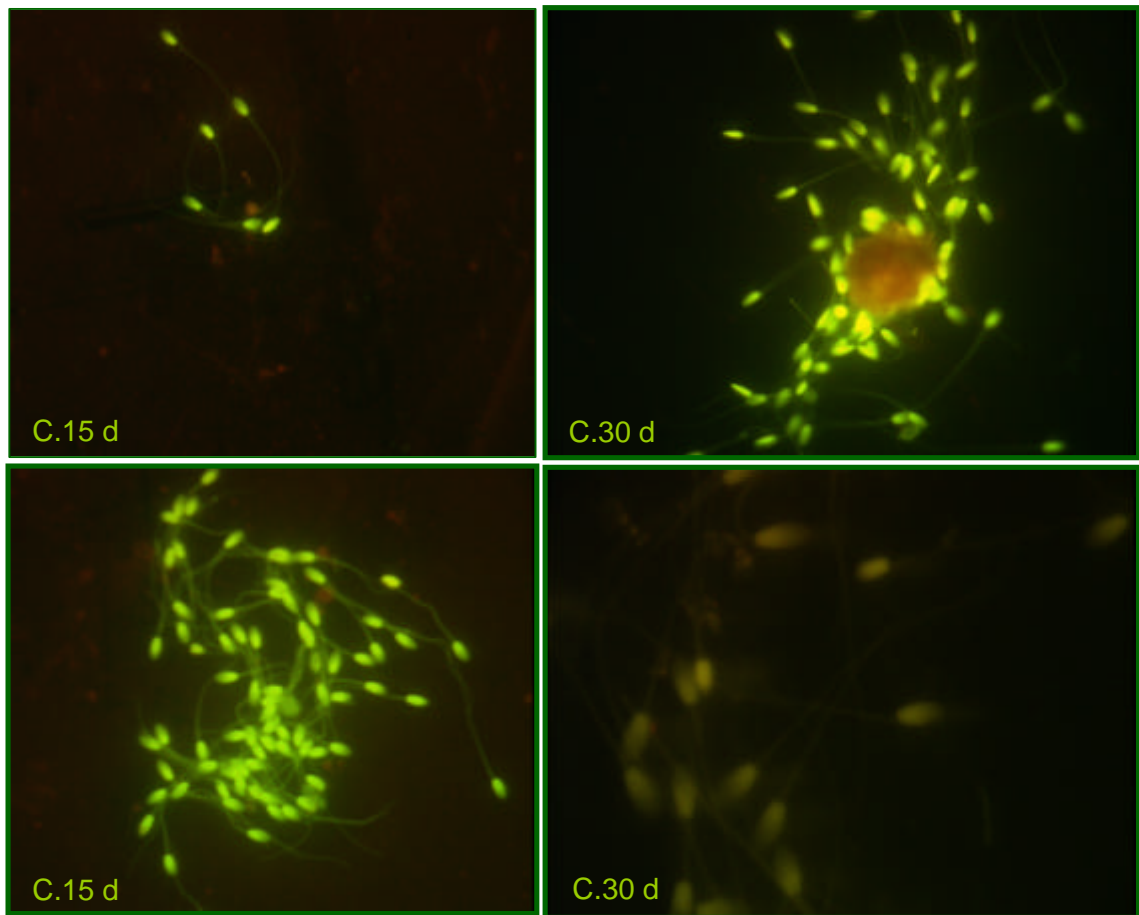
**Fig. 9** - (Dispersão) Distribuição da população de células que apresentam fluorescência verde e vermelha após SCSA e citometria de fluxo. Amostra *in natura* (A), amostra *in natura* / diluída (B) e amostra congelada (C). A coluna da esquerda as amostras sem tratamento ácido e a coluna da direita corresponde a amostras com tratamento ácido. Estes resultados correspondem a um animal que congelou mal.

**ESTABILIDADE DA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCSA)**  
**[amostras diluídas e congeladas]**



**Fig. 10** - (Dispersão) Distribuição da população de células que apresentam fluorescência verde e vermelha após SCSA e citometria de fluxo. Amostra diluída (A), amostra congelada (B). A coluna da esquerda as amostras sem tratamento ácido e a coluna da direita corresponde a amostras com tratamento ácido. Estes resultados correspondem a um animal que congelou bem.

**EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO NA CROMATINA ESPERMÁTICA  
[SCSA]**



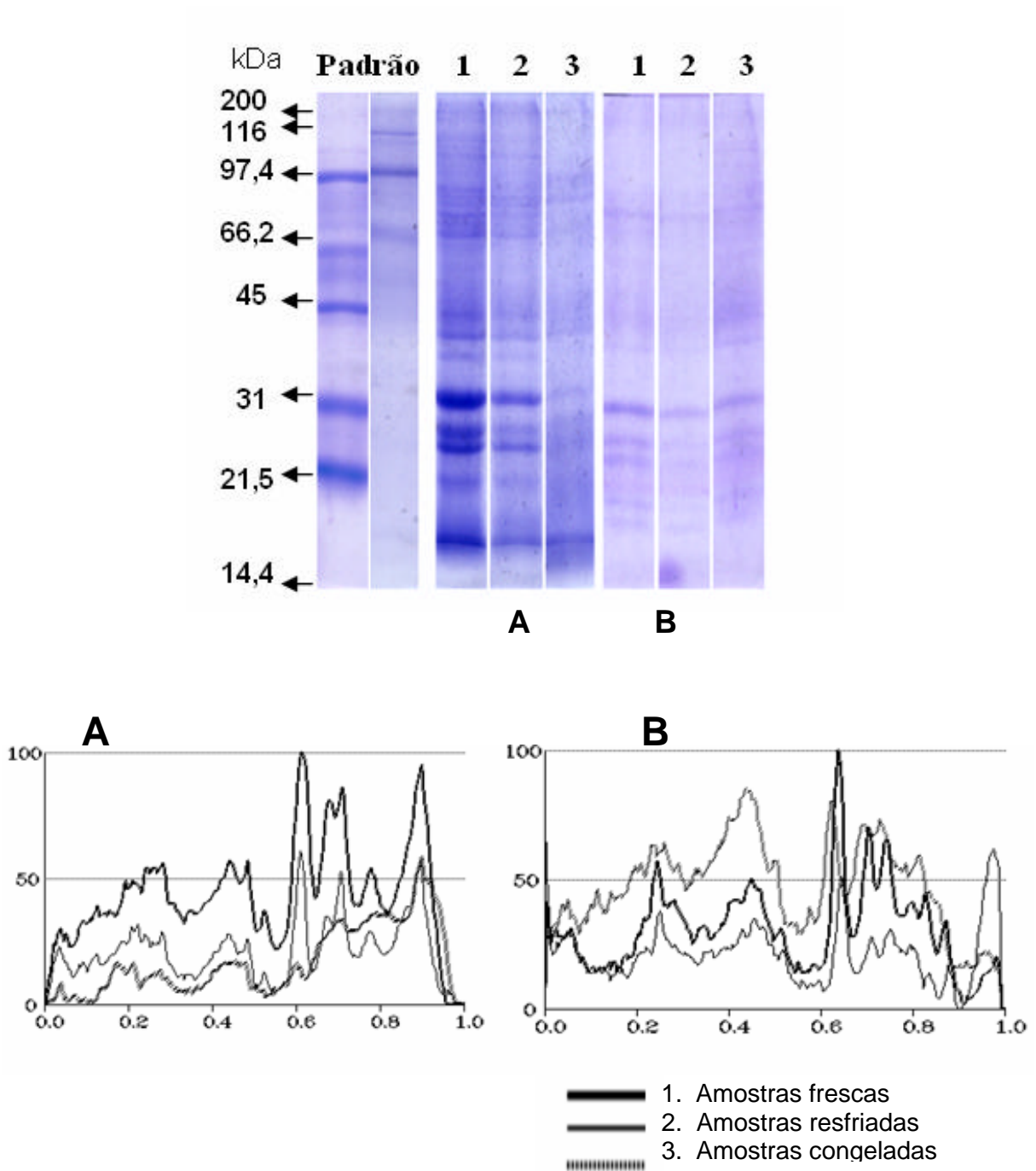
**Fig. 11** - Microfotografias de espermatozoides de ejaculado de eqüinos (*E. caballus*) (600x). Amostras criopreservadas durante 15 dias (A e B) e 30 dias (C e D) todas submetidas ao teste SCSA (sperm chromatin structure assay).

#### IV. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE O PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS

A figura 12 mostra um gel representativo (SDS-PAGE 12%) de proteínas espermáticas obtidas de amostras *in natura*, diluídas/resfriadas e congeladas de animais representativos do grupo de garanhões que obtiveram uma motilidade acima de 30% após o descongelamento e animais que obtiveram uma motilidade progressiva menor de 30%. Várias bandas protéicas (mais de 14 bandas entre 200 e 14 kDa) se destacaram nos espermatozóides provenientes de ejaculado de eqüinos. As proteínas majoritárias são aquelas de massas moleculares 87, 73, 62, 30, 28, 21 e 19 kDa. Algumas bandas protéicas se mantiveram, após resfriamento e congelamento das amostras, enquanto outras (62, 21, 19 kDa) decrescem notoriamente.

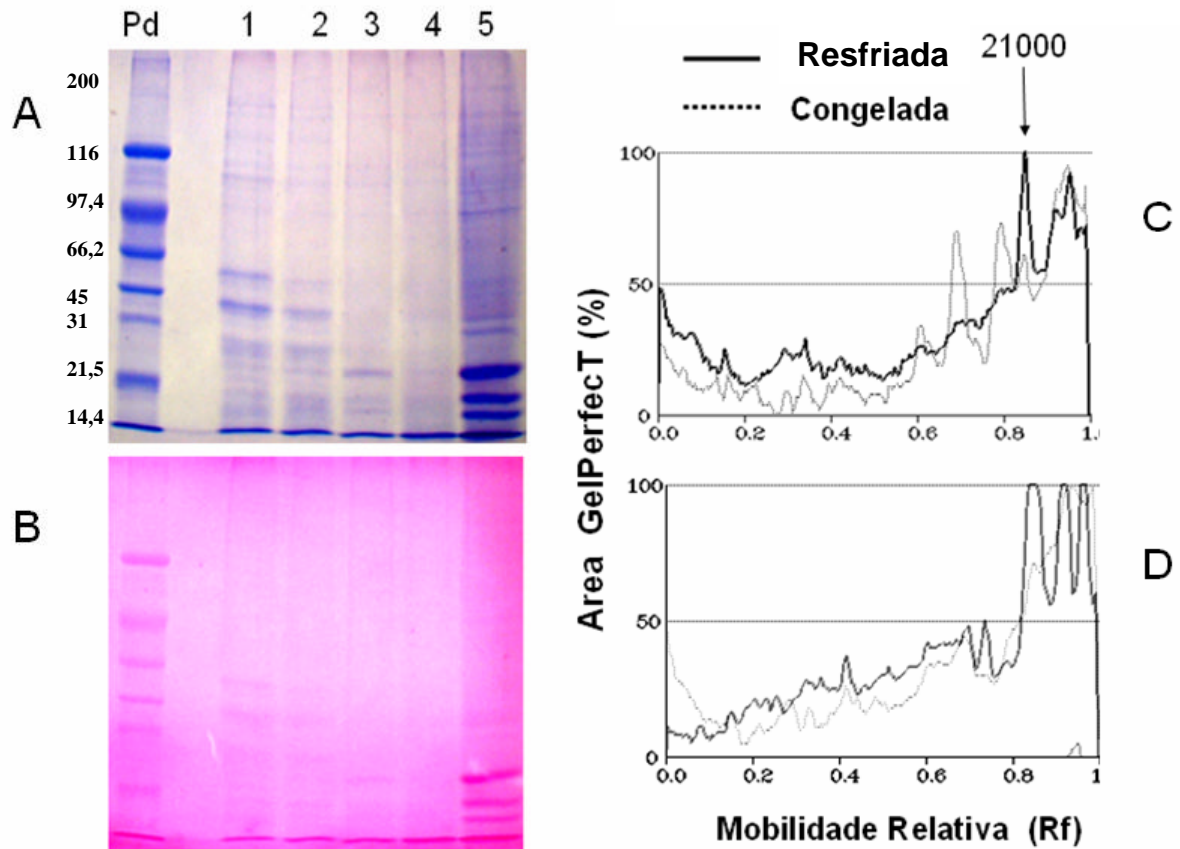
Cabe mencionar que se observaram algumas diferenças nos perfis eletroforéticos dos diferentes animais estudados. Assim por exemplo a glicoproteína de ~21kDa parece estar em menor concentração relativa nos espermatozóides de animais que apresentaram baixa congelabilidade. Simultaneamente aparecem outras bandas protéicas, de maior massa molecular. Em animais cujos espermatozóides foram mais resistentes ao processo de congelamento esta proteína também diminui, porém não observou a formação de bandas protéicas de maior massa molecular e sim proteínas de menor massa molecular (figura13).

PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS SDS – PAGE 12%



**Fig. 12** - Perfil protéico de espermatozóides de *E. caballus*. SDS-PAGE 12% de proteínas obtidas de espermatozóides de um garanhão que congelam bem (A) e de um animal que congelam mal (B) e as análises densitométricas correspondentes. Amostras *in natura* (1), resfriadas (2) e congeladas durante 7 dias (3).

## PROTEÍNAS E GLICOPROTEÍNAS ESPERMÁTICAS SDS – PAGE 10%



**Fig. 13** - Perfil protéico de espermatozoides de *E. caballus*. SDS – PAGE 10% de proteínas espermáticas corados com Azul de Coomassie (proteínas) (A) e com PAS (glicoproteínas) (B). Proteínas espermáticas de amostras congeladas 1,2,4; Proteínas espermáticas de amostras diluídas e resfriadas 3,5. (2 e 3 amostras de um garanhão que congelou mal; 4 e 5 pertencem a uma animal que congela bem). Densitograma comparando amostras resfriadas (diluídas) e congeladas do animal de bom congelamento I (C) e densitograma que compara as amostras resfriadas (diluídas) e congeladas de um animal que congelou mal (D).



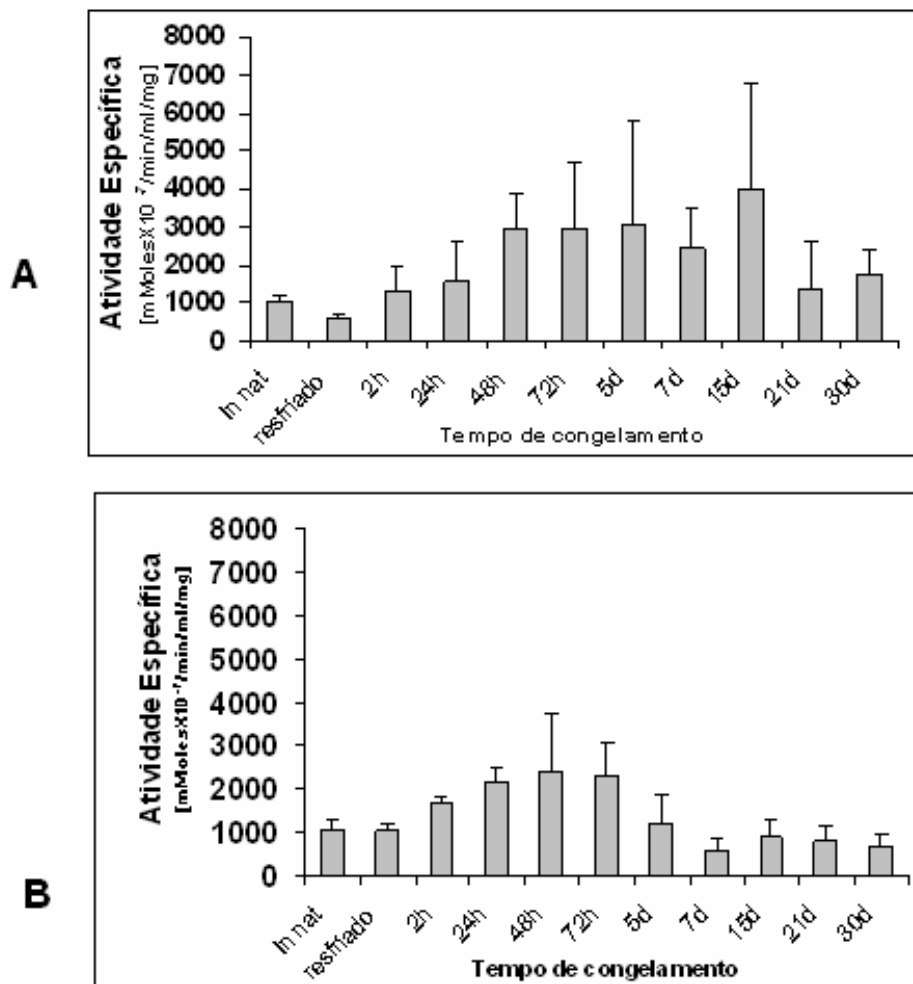
## V. EFEITO DA CRIOPRESERVAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DE GLICOSIDASES ESPERMÁTICAS

Foram realizados alguns ensaios fluorimétricos, visando determinar a atividade da a-glucosidase e a-manosidase nas amostras resfriadas e congeladas a diferentes intervalos de tempo (figura 14). Nossos resultados confirmaram a presença da atividade destas enzimas nos espermatozóides ejaculados de eqüino, embora em menor concentração relativa do que a encontrada em espermatozóides epididimários e plasma seminal como já foi assinalado em trabalhos prévios de nosso grupo. A atividade manosidásica é um pouco maior que a atividade glucosidásica nas amostras de espermatozóides de ejaculados de eqüinos.

O congelamento afetou a atividade específica das enzimas, que aparentemente aumenta nas amostras congeladas. Porém, é necessário realizar estes ensaios em um número maior de casos já que estudos prévios realizados no laboratório mostraram um decréscimo da atividade específica destas enzimas após 30 dias de congelamento.

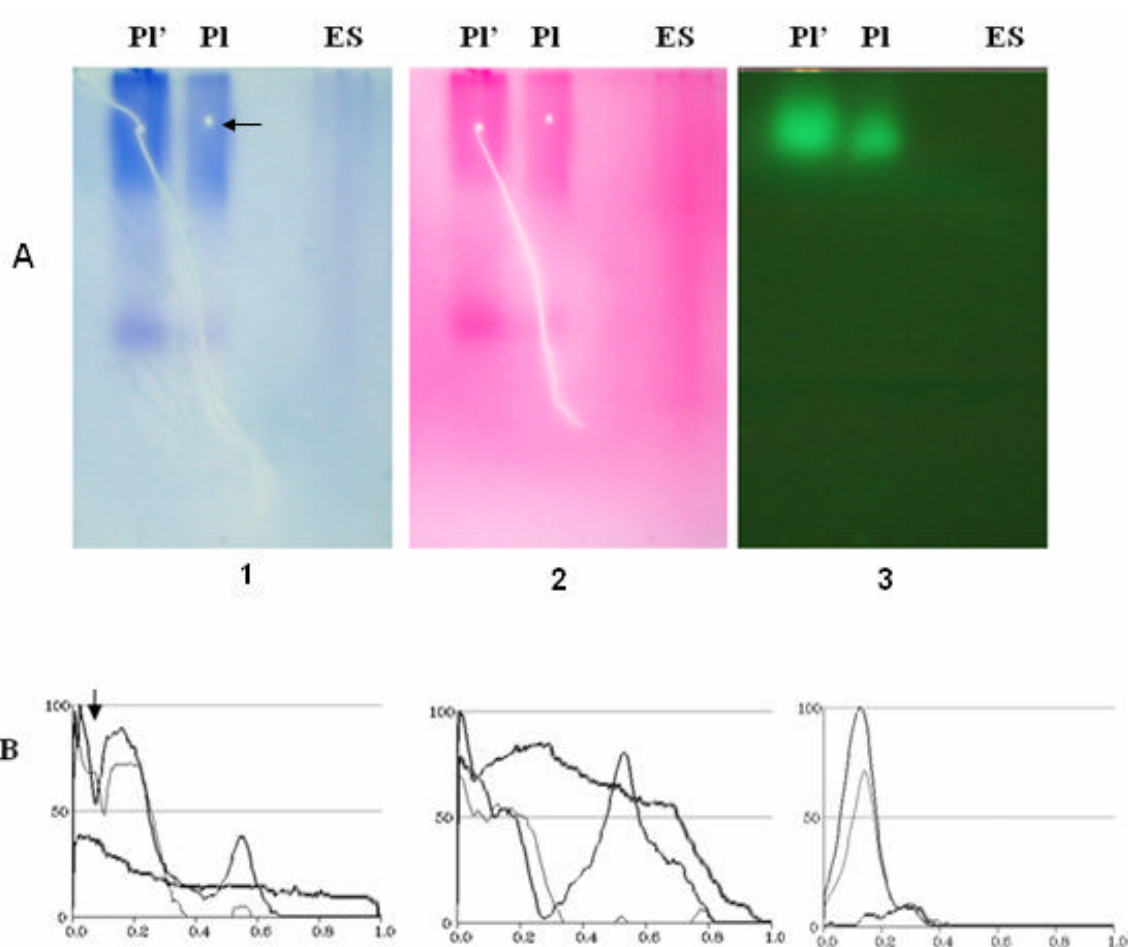
Os ensaios de atividade manosidásica em amostras espermáticas após a eletroforese em géis nativos e desnaturantes deram resultado negativo (fig. 15), porém os mesmos ensaios realizados com uma amostra de plasma seminal, que apresenta maior atividade glicosidásica, foram positivos [controle da reação] (Fig. 16). No gel desnaturante se calculou a massa molecular da manosidase do plasma seminal (~200 kDa). Esta enzima tem alta atividade específica e seu comportamento é linear, o que indica que é uma só espécie apresentando característica glicoprotéicas.

## ATIVIDADE ESPECÍFICA DE GLICOSIDASES ESPERMÁTICAS EM AMOSTRAS CRIOPRESERVADAS



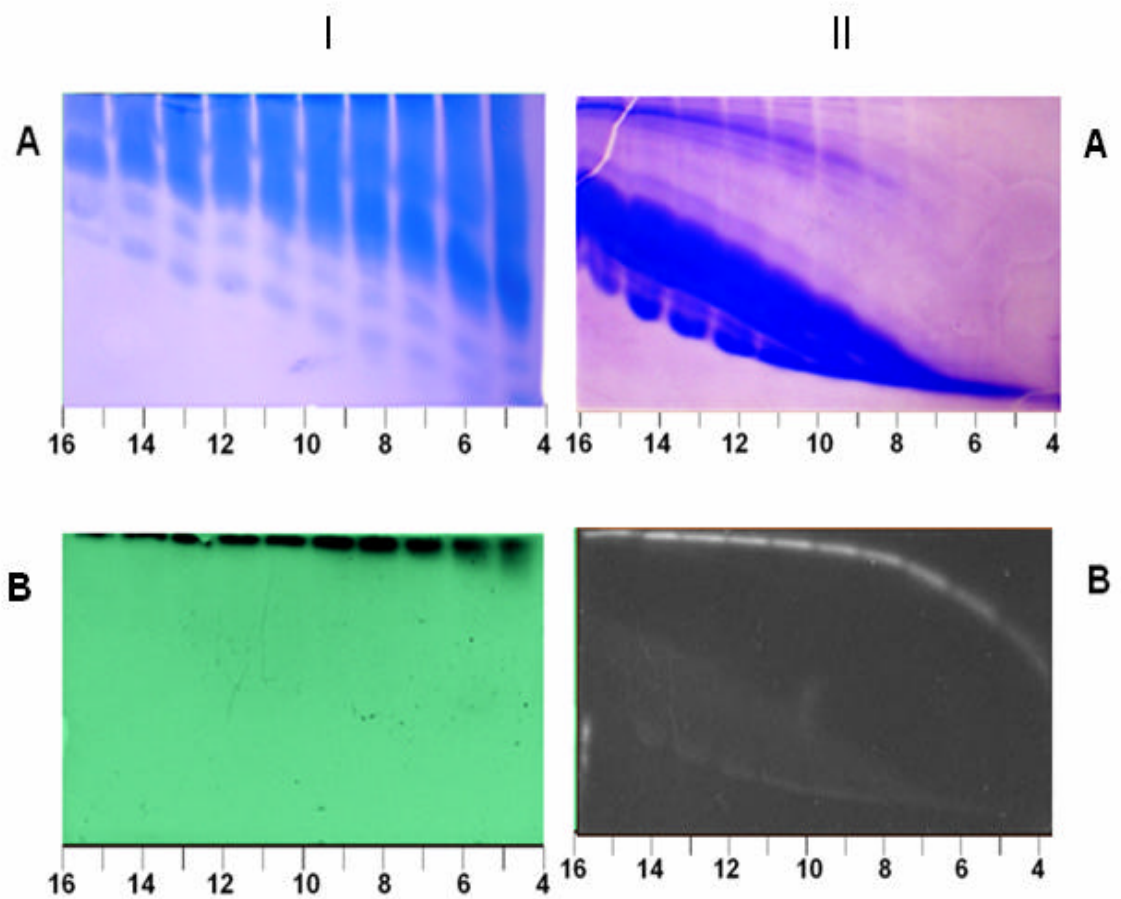
**Fig. 14** – Efeito da criopreservação na atividade específica de  $\alpha$ -D-mannosidase (A) e  $\alpha$ -D-glucosidase (B).

## ATIVIDADE MANOSIDÁSICA EM PROTEÍNAS ESPERMÁTICAS



**Fig. 15** - Atividade manosidásica em plasma seminal e espermatozóides de eqüinos. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida 6% em condições nativas. PI' plasma seminal puro; PI plasma seminal diluído (1:1); ES proteínas espermáticas. 1) gel corado com azul de Coomassie, 2) gel corado com PAS. 3) atividade manosidásica (B) Análise densitométrica dos géis. A seta refere-se a posição da atividade manosidásica.

**ATIVIDADE MANOSIDÁSICA EM GÉIS NATIVOS E DESNATURANTES  
DE PLASMA SEMINAL**



**Fig. 16** - Géis gradientes (4-16%) de poro transverso. Gel nativo I e Gel desnaturante II; A azul de coomassie R-250, B tratado com 4-metilumbeliferil D-manopiranosídeo 2 mM, em tampão fosfato 0,2M pH6,0 a 37°C por 1 h.

## VI. DISCUSSÃO E COMENTÁRIOS:

A criopreservação de sêmen é um procedimento de rotina em centros de reprodução assistida e laboratórios de andrologia, principalmente antes da quimioterapia, radioterapia e/ou tratamentos cirúrgicos que possam conduzir a falha testicular ou a disfunção ejaculatória, preservando assim a fertilidade do indivíduo através da fertilização *in vitro* (FIV) ou por injeção intracitoplasmática do espermatozóide (ICSI) (DONNELLY et al., 2001).

O espermatozóide criopreservado deve conservar sua atividade metabólica, estrutura e funcionalidade. Porém, efeitos osmóticos e estresse oxidativo, entre outras injúrias que o congelamento e descongelamento das amostras produzem, afetam a motilidade e capacidade fertilizante dos espermatozoides. A susceptibilidade do gameta à criopreservação difere entre espécies. Esta diferença poderia estar relacionada com diferenças bioquímicas e fisiológicas dos gametas e/ou variações fisiológicas e bioquímicas do transporte espermático no trato reprodutivo da fêmea em cada espécie (HOLT, 2000).

Apesar da intensa procura e avaliação das variadas metodologias descritas, um procedimento padrão que otimize a recuperação da motilidade do espermatozóide criopreservado não tem sido estabelecido (NALLELLA et al., 2004).

Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram alterações significativas em algumas das características do espermatozóide eqüino, pós-congelamento / descongelamento, entre elas a diminuição da percentagem de células com motilidade progressiva, alterações morfológicas na região da cabeça espermática (principalmente ao nível acrossomal) e no flagelo, mudanças na cromatina nuclear e principalmente perda da integridade da membrana plasmática, como é sugerido pela resposta das células espermáticas aos testes de HOS, e também pelas mudanças no perfil protéico, glicoprotéico e enzimático (manosidase e glucosidase).

Os espermatozoides são células bastante frágeis e perdem rapidamente sua viabilidade quando mantidas a temperatura ambiente e sem diluentes (PICKETT e AMANN, 1993; SNOECK e HENRY, 2001). A perda da motilidade após o transporte e armazenamento das amostras tem sido associada com o aumento da

osmolaridade do plasma seminal e indução de dano peroxidativo da membrana espermática. Ambos podem ser parcialmente prevenidos pelos diluentes utilizados nos protocolos de criopreservação. Esta maior susceptibilidade das amostras *in natura* em relação às diluídas foi comprovada não só no espermiograma de rotina, mas também quando se aplicou o procedimento SCSA, que mostrou um maior dano no DNA de células provenientes de amostras *in natura* que das resfriadas. O resfriamento e diluição das amostras preservaram melhor a estrutura destas células. Porém, o resfriamento requer alguns cuidados para prevenir o choque térmico da célula espermática. A adição de diluentes proporciona condições mais adequadas para a manutenção da viabilidade espermática como pressão osmótica e eletrolítica apropriada, substratos energéticos, proteção contra o choque térmico e contra ação de bactérias (CARNEIRO, 2002). Segundo este autor a diluição mais adequada é de 1 parte de sêmen para 3 partes de diluente (contendo uma concentração final de  $25 - 50 \times 10^6$  espermatozóides / mL). Contudo, deve-se ter em mente que alguns componentes do diluente também podem estimular o dano peroxidativo. Enquanto uma leve peroxidação da célula promove a capacitação, a oxidação excessiva altera a estrutura da membrana plasmática com conseqüente perda da motilidade. A fertilidade reduzida de alguns garanhões após estes procedimentos provavelmente esteja relacionada não só com a tolerância espermática ao processo de resfriamento em termos de longevidade e motilidade, mas também a fatores individuais (SQUIRE *et. al.*, 1998, CARNEIRO, 2002). Os valores médios de motilidade em sêmen *in natura* e diluído encontrados neste trabalho são correspondentes aos mencionados na literatura.

Nossos resultados mostraram que a motilidade e vigor da célula espermática, avaliados por estimativa visual, diminuíram aproximadamente 40% (76% versus 34%) após congelamento das amostras. Porém existe uma grande variabilidade entre garanhões (36% deles foram classificados como animais cujos espermatozóides apresentam boa congelabilidade, 21% foram de “moderada congelabilidade” e 43% apresentaram 15%, ou menos, espermatozóides com motilidade progressiva após a criopreservação). Dados obtidos da literatura mostram que de uma população de 341 animais 35% dos garanhões produziram sêmen que congela bem, 25% dos garanhões congelaram moderadamente, enquanto que em

40% dos animais o congelamento afetou de forma drástica a motilidade (PICKETT e AMANN, 1993). Estes dados são importantes já que a seleção dos garanhões candidatos ao congelamento de sêmen é geralmente baseada em fatores tais como performance atlética, beleza e porte e muitas vezes não levam em consideração os critérios de fertilidade e/ou capacidade de congelamento. Segundo Carneiro (2002), baseado em dados pessoais e da comunidade científica norte-americana e européia, 30% dos garanhões congelam bem, 40% são satisfatórios e em 30% deles os espermatozóides não sobrevivem ao processo de congelamento. Nestes estudos foram utilizados diferentes protocolos de congelamento e um número considerável de garanhões. A razão para esta variação individual na resistência ao congelamento / descongelamento não está bem estabelecida. A motilidade aceitável pós-congelamento varia de acordo com os autores. A maioria deles sugere que esta taxa deveria estar entre 25 e 30%. Apesar da análise da motilidade espermática ser utilizada usualmente na avaliação de sêmen pré e pós - congelamento das amostras, outras metodologias devem ser associadas a este exame desde que a motilidade não está altamente correlacionada com a taxa de prenhez [r:0,3 - 0,65] (GRAHAM, 1996, SAMPER e MORRIS, 1998).

O teste hiposmótico, que avalia integridade funcional (permeabilidade) da membrana plasmática, principalmente do flagelo, também mostrou uma queda significativa nas amostras congeladas. A baixa tolerância osmótica do espermatozóide eqüino a condições não-osmóticas tem sido também assinalada por outros autores (BALL e VO, 2001). Este teste tem sido correlacionado com fertilidade potencial (SMITH *et al.*, 1992). Estes autores mostram que indivíduos de fertilidade comprovada respondem ao teste de HOS de forma positiva; enquanto indivíduos oligo, asteno ou oligoastenospérmico mostraram um grau de resposta significativamente menor ( $p < 0.001$ ). Eles também assinalaram que o teste HOS tem alta correlação com motilidade progressiva e viabilidade, porém não se correlaciona com concentração e percentagem de patologias espermáticas (SMITH *et al.*, 1992).

Nossos dados mostraram diferenças no comportamento de algumas proteínas presentes em espermatozóides eqüinos após congelamento. O perfil protéico de animais que “congelam bem” em relação àqueles que “congelam mal” é relativamente similar, porém algumas proteínas diminuem sua concentração relativa,

provavelmente por proteólise, após o congelamento das amostras. A proteína de 21 kDa, por exemplo, tem uma concentração relativa menor nos espermatozóides de animais que congelam mal. Após o congelamento aparecem outras bandas protéicas, de maior massa molecular, o que poderia ocorrer devido à formação de agregados protéicos durante o processo de criopreservação, porém tal hipótese requer aprofundar mais estudos para sua confirmação. Em animais cujos espermatozóides foram mais resistentes ao processo de congelamento a concentração desta proteína também diminui, mas não foi observada a formação de bandas protéicas de maior massa molecular e sim de proteínas de menor massa molecular. Um estudo mais abrangente deve ser feito para determinar a existência de proteínas que possam ser utilizadas como marcadores da resistência do espermatozóide ao congelamento.

Um estudo recente realizado em peixes (robalo de mar) mostra degradação de proteínas espermáticas após criopreservação, duas das quais podem estar relacionadas com a perda de motilidade (ZILLI *et al.*, 2005).

A atividade glicosidásica ( $\alpha$ -D-manosidase e  $\alpha$ -D-glucosidase) não foi detectada em géis, provavelmente pela baixa concentração desta proteína nos espermatozóides ejaculados. Entretanto, a atividade  $\alpha$ -D-manosidase foi elevada no plasma seminal. Estudos prévios realizados em nosso laboratório verificaram a presença destas enzimas tanto no fluído como em espermatozóides epididimários de *E. caballus*, com uma expressão diferencial ao longo do conduto (DIAS, 2002; DIAS *et al.*, 2003). A expressão da enzima é maior em espermatozóides epididimários que em aqueles obtidos de ejaculado (DIAS, 2002).

Nossos ensaios mostraram que a manosidase é uma glicoproteína de ~200 kDa no plasma seminal. A massa molecular da proteína em espermatozóide epididimários foi calculada em ~154kDa (DIAS, 2002). Sugere-se que esta enzima é um oligossacarídeo altamente manosilado (OKAMURA *et al.*, 1995). Estes autores, baseados no comportamento da enzima em função do pH, termoestabilidade e comportamento eletroforético, em condições nativas e desnaturantes, sugerem que a enzima presente no fluído epididimário pode estar formando agregados transitórios (DIAS, 2002).



Chamou-nos a atenção o fato da atividade glicosidásica, medida fluorimetricamente em amostras *in natura*, diluídas e congeladas, ter aumentado significativamente nas amostras congeladas. Isto poderia ser devido à presença de um grande número de células com dano no acrossoma, ou a uma provável contaminação das amostras com bactérias. No acrossoma existe um número importante de enzimas, entre elas glicosidases, portanto as alterações nesta estrutura poderia ser motivo da atividade elevada destas enzimas nas amostras congeladas. A técnica de SCSA também demonstrou, após congelamento e descongelamento das amostras, uma alta porcentagem de células com danos no DNA, apoptóticas e/ou mortas, o que está de acordo com a baixa porcentagem de espermatozoides vivos observados nesta amostras (no espermiograma e teste de vitalidade). Fagundes (2003) mostra que pelo menos 35% dos espermatozoides de *E. caballus* mostram dano no acrossoma após congelamento / descongelamento das amostras (FAGUNDES, 2003).

Injúrias produzidas pelo congelamento e descongelamento das amostras foram também observadas pela microscopia eletrônica de varredura (MEV), entre elas: rupturas da membrana, especialmente na região acrossomal e anormalidades no pescoço do espermatozoide. A desestabilização e rompimento das membranas do espermatozoide, após criopreservação, pode ser uma consequência das trocas de fase de transição e aumento da peroxidação dos lipídios. As células somáticas contêm antioxidantes no citoplasma, no entanto, os espermatozoides perdem seu citoplasma durante a maturação, o que os deixa numa eventual desvantagem. Entretanto, eles são protegidos de agentes oxidantes pelo plasma seminal que contém enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, entre outras) e seqüestradores como a albumina e taurina (DONNELLY *et al.*, 2001). Por isso alguns autores recomendam a adição de plasma seminal ou de antioxidantes no processamento das amostras criopreservadas. Porém, em relação aos efeitos destes tratamentos existem controvérsias (BAUMBER *et al.*, 2003; CHATTERJEE e GAGNON, 2001).

A estabilidade nuclear, medida pela sua resistência a agentes redutores de RS-SR não mostrou diferenças importantes entre amostras *in natura*, diluídas e criopreservadas de sêmen eqüino. Resultados similares foram comunicados por

Huret (1984) que estudou o efeito da criopreservação no potencial de descondensação da cromatina de espermatozóides humanos.

A manutenção dos grupamentos tióis no correto grau de oxidação parece ser importante nos eventos que precedem à fertilização, já que o bloqueio de tióis livres ou a redução de dissulfetos com DTT inibe a capacitação, reação acrossômica e ligação ao ovócito (DIAS, 2004).

Espermatozóides ejaculados humanos exibem uma grande heterogeneidade em relação à estabilidade da cromatina (estabelecida como a resistência a SDS – DTT). Os espermatozóides imaturos ou com DNA alterado apresentam um menor número de pontes dissulfeto entre protaminas nucleares sendo mais susceptíveis aos testes de descondensação da cromatina (LOVE e KENNEY, 1999). Dados prévios de nosso laboratório indicam que espermatozóides imaturos de eqüinos, os quais contem menos pontes dissulfeto são menos resistentes a agentes desnaturantes, que aqueles maduros obtidos da cauda do epidídimo ou de ejaculado (DIAS *et al.*, 2006).

O “status” de maturação do núcleo espermático também pode ser determinado pela técnica de laranja de acridina. Nos espermatozóides maduros ricos em RS-SR, a dupla hélice do DNA se mantém intacta, ainda após tratamento ácido ou calor. As moléculas de AO se intercalam no DNA e emitem fluorescência verde; no caso de núcleos pobres em RS-SR o DNA pode ser desnaturado a DNA de fita simples, e o complexo AO/DNA fita simples emite fluorescência no vermelho. A técnica SCSA utilizada neste estudo mede por citometria de fluxo o efeito do tratamento ácido no DNA de células tratadas com laranja de acridina.

Não obstante a alta estabilidade dos espermatozóides criopreservados, frente aos agentes redutores de RS-SR, os ensaios com a técnica de SCSA, mostraram que a criopreservação aumenta a susceptibilidade do DNA de espermatozóides de eqüinos à desnaturação. Porém, diferenças individuais entre animais foram observadas. Decréscimo significativo (entre 20 e 40%) na integridade do DNA após o congelamento / descongelamento de amostras de sêmen humano (EVENSON *et al.*, 1999; SALEH, 2002), de carneiro (PERIS *et al.*, 2004) e porcos (EVENSON *et al.* 1994). Dados prévios de nosso laboratório indicam que os espermatozóides imaturos são mais susceptíveis a desnaturação ácida que espermatozóides maduros

(DIAS *et al.*, 2006). Estes resultados podem estar relacionados a anormalidades produzidas durante a diferenciação ou a maturação do espermatozóide que levam a um empacotamento incorreto da cromatina. A cromatina espermática normal pode conter quebras de fitas de DNA que são escondidas durante a condensação do gameta. Problemas de empacotamento da cromatina tornam essas rupturas acessíveis à técnica de SCSA (SAILER *et al.*, 1995).

Uma grande variedade de fatores pode induzir mudanças da cromatina, resultando em um DNA mais susceptível a desnaturação ácida, entre eles: o status de maturação do gameta, produção de ROS, estresse oxidativo, estresse térmico, apoptoses, tempo de armazenamento das amostras, tipo de diluidor utilizado, e inclusive manejo das amostras (como o tempo e a força da centrifugação utilizada para separar os espermatozoides do plasma seminal) (DIAS *et al.*, 2006; LOVE e KENNEY 1999; LOVE, 2005). SCSA tem sido correlacionado com fertilidade, em várias espécies incluindo cavalos (SAMPER e MORRIS, 1998; LOVE, 2005). Os estudos realizados em cavalos sub-férteis versus férteis mostram que nos primeiros há uma susceptibilidade aumentada à desnaturação (LOVE *et al.*, 2002; LOVE, 2005). Um estudo recente (LOVE, 2005) realizado em garanhões de alta fertilidade, mostrou a relação entre motilidade espermática e qualidade do DNA medida por SCSA em amostras contendo diferentes quantidades de plasma seminal (0, 10, 20%). Foi demonstrado que a motilidade não muda após 48h de armazenamento, porém a qualidade do DNA declinou significativamente. Isto sugere que como a quantidade de plasma aumenta mesmo os animais férteis podem experimentar um declínio na qualidade do DNA o que não corresponde com decréscimo da motilidade espermática. Nos animais sub-férteis a integridade do DNA é ainda mais afetada.

Contudo, a utilização de sêmen criopreservado apresenta uma série de vantagens como possibilidade de armazenamento e transporte de sêmen através de longas distâncias e por um período prolongado de tempo, aumento da oferta de material genético para um mercado potencialmente aberto, uso do sêmen após perda da função reprodutiva, redução dos custos associados com o transporte de éguas e potros, possibilidade maior de acesso aos criadores a garanhões de linhagem superior, aumento no controle de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis. Uma outra vantagem é a possibilidade de usar o garanhão durante

todo o ano, já que como se confirmou no presente estudo a motilidade e os outros parâmetros analisados não mudam significativamente ao longo do ano.

A grande desvantagem desta técnica é a crioinjúria à célula espermática e conseqüente redução da fertilidade. Pesquisa continuada na criobiologia do sêmen que resulte num incremento da viabilidade e potencial fertilizante da amostra, não só levará a substituição do uso comercial de sêmen resfriado por sêmen congelado nos programas de inseminação, tornando viável o transporte ao nível nacional e internacional. Permitindo o melhoramento genético das raças atuais.

## VI. CONCLUSÕES

A criopreservação afeta a estrutura e função do espermatozóide eqüino, porém uma grande variabilidade na resposta dos gametas entre garanhões e inclusive entre ejaculados de um mesmo animal foi observada. Isto é, a capacidade da célula espermática a sobreviver ao procedimento varia não só entre espécies, mas também entre indivíduos. A aplicação de técnicas moleculares para a investigação destas diferenças pode levar a uma nova direção na compreensão da crioinjuria.

Não se observaram diferenças estacionais na resposta a criopreservação no grupo de animais estudado.

A motilidade progressiva, vigor, e capacidade das células a responderem ao estresse osmótico diminuem significativamente após o congelamento / descongelamento das amostras.

Após a criopreservação observou-se uma maior percentagem de células com rupturas no DNA que nas amostras resfriadas (diluídas). Discute-se também a possibilidade de dano durante o manejo das amostras.

A estabilidade nuclear medida pelos testes de descondensação, que avaliam a presença de pontes dissulfeto entre protaminas nucleares não mostraram diferenças significativas antes e após o congelamento das amostras.

Os perfis protéicos das amostras resfriadas e criopreservadas são relativamente similares, porém constatou-se ocorrência de proteólises em proteínas específicas. Sugere-se que proteínas espermáticas de animais que “congelam mal” podem formar agregados de glicoproteínas de baixa massa molecular após o congelamento / descongelamento das amostras.

Recomenda-se a utilização de metodologias complementares aos espermogramas de rotina na avaliação de um reprodutor, já que a complexidade da célula espermática e da membrana plasmática em particular dificulta a avaliação só por uma metodologia.

O melhor conhecimento dos efeitos da criopreservação sobre as características espermáticas permitirá orientar novos protocolos, possibilitando incrementar a viabilidade espermática do sêmen eqüino criopreservado.

## VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA MA, LANDIM-ALVARENGA FC, MOREIRA RM, CESARINO MM. 2000. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet. J.* 32(6):541-545.
- AMANN RP, PICKETT BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7:145-173.
- ANCHORDOGUY TJ, RUDOLPH AS, CARPENTER JF, CROWE JH. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology.* 24(4):324-331.
- AURICH JE, KHUNE A, HOPPE H. 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology.* 46:791-797.
- BALL BA, Vo A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J Androl.* 22(6):1061-1069.
- BAKER CAV, GANDIER, JCC. 1957. Pregnancy in a mare resulted from frozen epididymal spermatozoa. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 21:47-51.
- BAUMBER J, BALL B, LINFOR JJ, MEYERS S. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J. Androl.* 24(4):621-628.
- BENCHIMOL M. 1996. Congelamento e criofratura. Em: Benchimol M. (ed); Atias, M; Cunha e Silva, N.L. e Carvalho, T.U., *Métodos de Estudo da Célula*. Fenorte UENF, Campos – RJ, 101-107.
- BRADFORD MM. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- BRAUN J, TORRES-BOGGINO F, HOCHI S, OGURI N. 1994. Effect of seminal plasma on motion characteristics of epididymal and ejaculated stallion spermatozoa during storage at 5° C. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*101(8):319-322.

- BLOTTNER S, WARNKE C, TUCHSCHERER A, HEINEN V, TORNER H. 2001. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim. Reprod. Sci.* 31; 65 (1-2):75-88.
- BOZZO S, RETAMAL C. 1991. Geles unidimensionales. Un nuevo método densitométrico para computadores personales. *Arch. Biol. Med. Exp.* 24: 181.
- CALVIN HI, BEDFORD JM. 1971. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 13:65-75.
- CARNEIRO GF. 2002. Transport and cryopreservation of equine semen. *Rev. Bras. Reprod. Anim. Suppl.* 5, 37-42.
- CHATTERJEE S, GAGNON C. 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 59(4):451-458.
- COTTORELLO ACP, HENRY M. 2002. Principles of cryopreservation, freezing and assessment of equine sêmen; Review. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 26(1):14-25.
- CROSS NL, 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol Reprod. Review.* 59(1):7-11.
- CURRY MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *J. Reprod Fertil.* 5, 46-52.
- DALIMATIA AM, GRAHAM JK. 1997. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology* 48:831-841.
- DAVIS BJ. 1964. Disc eletrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.
- DELL'AQUA Jr JA. 2000. Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado eqüino. *Dissertação de mestrado apresentada à FMVZ-UNESP.* Botucatu.
- DENNISTON DJ, GRAHAM JK, SQUIRES EI. 1997. The effects of liposomes composed of phosphatidylserine and cholesterol on fertility rates using frozen thawed equine spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 17:675-676.

- DIAS AJB. 2002. Detecção e caracterização de glicosidases no epidídimo e sêmen de eqüinos. *Tese Doutorado LBCT. CBB. UENF*. Campos dos Goytacazes.
- DIAS AB, MAIA MAS, RETAMAL CA, LÓPEZ ML. 2003. Identification and partial characterization of  $\alpha$ -glucosidase activity in equine epididymal fluid. *Theriogenology*. 61:1545-1558.
- DIAS GM. 2004. Avaliação das características nucleares de espermatozoides imaturos e maduros de *Equus caballus*. *Monografia LBCT CBB UENF*. Campos dos Goytacazes.
- DIAS GM, RETAMAL CA, TOBELLA L, ARNHOLDT AC, LOPEZ ML. 2006. Nuclear status of immature and mature stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 16; in press.
- DONNELLY ET, McCLURE N, LEWIS SEM. 2001. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil. steril*. 76(5):892-900
- DROBINSKI I, THOMAS PG, BALL PA. 1995. Cryopreservation reduced the ability of equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cells and zona pellucidae in vitro. *J. Androl*. 16:536-542.
- EVENSON DP, BAER RK, JOST LK. 1989. Flow cytometric analysis of rodent epididymal spermatozoa chromatin condensation and loss of free sulfhydryl groups. *Mol Reprod Dev*. 1(4):283-288.
- EVENSON DP, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED MR. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 5: 210(4474):1131-1133.
- EVENSON DP, JOST LK, MARSHALL D, ZINAMAN MJ, CLEGG E, PURVIS K, DE ANGELIS P, CLAUSSEN OP, 1999. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility *Clinic. Hum. Reprod*. 14:1039 – 1049.
- EVENSON DP, SAILER BL, JOST LK. 1995. Relationship between stallion sperm deoxyribonucleic acid (DNA) susceptibility to denaturation *in situ* and presence of DNA strand breaks: Implications for fertility and embryo viability. *Biol. Reprod*. 1:655-659.



- EVENSON DP, THOMPSON L, JOST LK. 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*. 41:637–651.
- FAGUNDES B. 2003. Análise do congelamento e descongelamento de sêmen eqüino utilizando proteínas do plasma seminal em diferentes concentrações. *Tese de Mestrado LMGGA CCTA UENF*. Campos dos Goytacazes.
- FELICIANO SILVA AED. 1998. Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: *Embrapa Recursos genéticos e Biotecnologia*, 38p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 35).
- GANDER JE. 1984. Gel protein stains: glycoproteins. *Methods Enzymol*. 104:447-451.
- GRAHAM JK. 1996. Cryopreservation of stallion spermatozoa. In Diagnostic techniques and assisted reproductive technology. Edited by E.L.Squires. *Vet. Clin. N. Amer.* 4(2):131-147.
- HOLT WV. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. Review. 18;62(1-3):3-22.
- HURET JL. 1984. Effect of cryopreservation on the nuclear chromatin decondensation ability of human spermatozoa. *Arch. Androl.*, 12(1):33-38.
- ISHIBASHI K, KUWAHARA MGUY, KAGEYAMA Y, TOHSAKA A, SUZUKI F, MARUMO F, SASAKI S. 1997. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water glycerol and urea. *J. of Biol. Chem.* 15;272(33):20782-20786.
- JASKO DJ. 1994. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars. Vet.* (10):156-165.
- JIANG MX, ZHU Y, ZHU ZY, SUN QY, CHEN DY. 2005. Effects of cooling, cryopreservation and heating on sperm proteins, nuclear DNA, and fertilization capability in mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 72(1):129-134.
- KVIST U, KJELLBERG S, BJORND AHL L, SOUFIR JC, ARVER S. 1990. Seminal fluid from men with agenesis of the Wolffian ducts: zinc-binding properties and effects on sperm chromatin stability. *Int. J. Androl.* 13(4): 245-252.

- LAEMMLI UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (London). 227:680-685.
- LEIVA S. 1981. Caracterización del complejo ADN/Proteínas del núcleo del espermatozoide de mamíferos euterianos: Aspectos citoquímicos y ultraestructurales. *Tesis Magíster en Ciencias Biológicas*. Santiago, Universidad de Chile.
- LEIBO SP. 1976. Freezing damage of bovine erythrocytes: simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures. *Cryobiology*. 13(6):587-598.
- LOOMIS PR. 2001. The equine frozen semen industry. *Anim. Reprod. Sci.* 68:191-200.
- LOVE CC, KENNEY RM. 1999. Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol. Reprod.* 60:615-620.
- LOVE CC, THOMPSON JA, LOWRY VK, VARNER DD. 2002. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility, *Theriogenology* 57:1135-1142.
- LOVE CC. 2005. The sperm chromatin assay: A review of clinical applications. *Anim. Reprod. Sci.* 89:39-45.
- MAZUR P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247:125-142.
- MILLER MA, MASSUI Y. 1982. Changes in the stain ability and sulfhydryl level in the sperm nucleus during sperm-oocyte interaction in mice. *Gamete Res.* 5:167-179.
- NALLELLA KP, SHARMA RK, SAID TM, AGARWAL A. 2004. Inter-sample variability in post-thaw human spermatozoa. *Cryobiology* 49(2):195-199.
- OKAMURA N, TAMBA M, LIAO HJ, ONOE S, SUGITA Y, DACHEUX F, DACHEUX JL. 1995. Cloning of complementary DNA encoding a 135-kilodalton protein secreted from porcine corpus epididymis and its identification as an epididymis-specific alpha-mannosidase. *Mol. Reprod. Dev.* 42(2):141-148.
- OLLERO M, BESCOS O, CEBRIAN-PEREZ JA, MUINO-BLANCO T. 1998. Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process. *Theriogenology*. 49(3):547-555.
- PALMER E, MASGISTRINI M. 1992. Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. *Acta Vet Scand Suppl.* 88:137-152.

- PAPA FO. 1988. Congelamento do sêmen e inseminação artificial. *An.VII Congr. Bras. Reprod. Anim.* Campinas/SP: 75-79.
- PAPA F, ALVARENGA MA, DELL 'AQUA J. 2002. J. Manual de Andrologia e Manipulação de sêmen eqüino. Apostila.
- PARKS JE, GRAHM JK. 1992. Effects of cryopreservation on sperm membranes. *Theriogenology.* (38):209-222.
- PERIS SI, MORRIER A, DUFOUR M, BAILEY JL. 2004. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J. Androl.* 25(2):224-233.
- PICKETT BW, AMANN RP. 1993. Cryopreservation of semen. In: Mckkinon, A O. And Voss, J.L. (eds). *Eq. Reprod.*, Philadelphia, Lea-Febiger: 769-789.
- POLGE C, SMITH AU, PARKES AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification e dehydration at low temperatures. *Nature* (London) 164-668.
- REISNER AH. 1984. Gel protein stain: A rapid procedure. *Met. Enzimol.* Part C. 439-441.
- RETAMAL CA, BABUL J. 1988. Determination of the molecular weight of protein by electrophoresis in slab gels with a transverse pore gradient of crosslinked polyacrylamide in the absence of denaturing agents. *Anal. Biochem.* 175(2) 544-547.
- RETAMAL CA, THIEBAUT P, ALVES EW. 1999. Protein purification from polyacrylamide gels by sonication extraction. *Anal. Bioch.* 268:15-20.
- ROBAIRE B, VIGER RS. 1995. Regulation of Epididymal epithelial cell functions. *Biol. Reprod.* 52, 226-236.
- SAILER BL, JOST K, EVENSON DP. 1995. Mammalian sperm DNA susceptibility to *in situ* denaturation associated with the presence of DNA strands breaks as measured by terminal deoxynucleotyl transferase assays. *J. Androl.* 16 (1): 80-87.
- SALAMON S, MAXWELL WMC, 1995. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37:185-249.
- SALAMON S, MAXWELL WMC. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:77-111.

- SALEH RA, AGARWAL A, NELSON DR, NADA EA, EL-TONSY MH, ALVAREZ JG, THOMAS AJJR, SHARMA RK. 2002. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril*. 78:313–318.
- SAMPER JC, MORRIS CA. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*. 49:895-903.
- SLAVICK T. 1987. Effect of glycerol on the penetrability of fresh ram spermatozoa with zone-free hamster eggs. *J. Reprod. Fertil.* (79):99-103.
- SMITH R, MADARIAGA M, BUSTOS-OBREGON E. 1992. Reappraisal of the hypo-osmotic swelling test to improve assessment of seminal fertility status. *Intern. J. Androl*. 15:5-13.
- SNOECK PPN, HENRY M. 2001. Efeito do resfriamento no sêmen eqüino. *Cad. Tec. Vet. Zootec*. 36: 54-61.
- SQUIRES EL, BRUBAKER JK, MCCUE PM, PICKETT BW. 1998. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. *Theriogenology*. 49(4):743-749.
- SUAREZ SS, IGNOTZ GG, LO MC, PEREZ CL, GWATHMEY TM. 2001. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biol. Reprod*. 64(6):1806-11.
- THOMAS PG, IGNOTZ GG, BALL BA, BRINSKO SP, CURRIE WB. 1995. Effect of coculture with stallion spermatozoa on de novo protein synthesis and secretion by equine oviduct epithelial cells. *Am J Vet Res*. 56(12):1657-62.
- UNANINAN MM. 2000. Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino. *Doc. 56. Embrapa*.
- VIDAMENT M, DUPERE AM, JULIENNE P. 1997. Equine frozen semen frezability and fertility fiel results. *Theriogenology*. 48:907-917.
- WATSON PF. 1995. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev*. 7:871-891.
- WILHELM KM, GRAHAM JK, SQUIRES EL. 1996. Effects of phosphatidylserine and cholesterol lipossomes on the viability, motility, and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. *Criobiol*. 33(3):320-329.

ZILLI L, SCHIAVONE R, ZONNO V, ROSSANO R, STORELLI C, VILELLA S. 2005.  
Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. *Biol. Reprod.* 72(5):1262-  
1267.