

**JULI ANGÉLICA NARVÁEZ CANCEMANSI**

**INFLUÊNCIA DO RECIPIENTE DE ARMAZENAMENTO (CILÍNDRICOS E PLANOS) SOBRE SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO**

**Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal, na Área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.**

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

**CO-ORIENTADOR: Dr. Mauricio Fraga van Tilburg**

**Campos Dos Goytacazes**

**2011**

**JULI ANGÉLICA NARVÁEZ CANCEMANSI**

**INFLUÊNCIA DO RECIPIENTE DE ARMAZENAMENTO (CILÍNDRICOS E PLANOS) SOBRE SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO**

**Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal, na Área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução.**

Aprovada em 18 de Fevereiro de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Marcus Antonio Pessanha Barreto (DSc. Produção Animal) – UENF

---

Prof. Eduardo Shimoda (DSc. Produção Animal) – Universidade Candido Mendes

---

Dr. Mauricio Fraga van Tilburg (Pós-Doutorando) – Universidade Federal do Ceará

---

Prof. José Frederico Straggiotti Silva (Ph.D, Medicina Veterinária) – UENF  
(Orientador)

*Ao meu Deus, pela sua misericórdia, graça e amor,  
quem foi, é e será a minha inspiração,  
e a fonte de todas as minhas alegrias.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal;

À Prof<sup>a</sup> Célia Raquel Quirino e aos professores José Frederico Straggiotti Silva e Victor Hurtado que acreditaram em mim e foram ajuda importante para realização do meu Mestrado;

À Prof<sup>a</sup> Nadir Francisca Sant`Anna do LBCT, pelo apoio;

Aos Professores, Ângelo Burla e Reginaldo Fontes da Silva;

Aos Técnicos, Bruna, Carla, João e Vânia;

Aos Colegas do laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA);

Ao técnico do laboratório de Tecnologia do sêmen, Fausto e à estagiária Edimara, por sua paciência, colaboração e disponibilidade;

Aos amigos, Andressa, Catia, Daniel, Flavia, Laerciana, Luana, Mario, Tiaguinho, Tracy, Vinicius, Wenitha;

Aos meus Conterrâneos e amigos, Amanda, Jorge, Liliana, Lorena, Mauricio por sua ajuda, amizade e grande apoio em momentos de tristeza e felicidade e especialmente ao Hector e Gina, por me socorrer nos momentos mais difíceis;

Ao co-orientador, Mauricio Fraga van Tilburg, por sua ajuda, a qual foi importante na realização deste trabalho;

Ao meu orientador, Prof. José Frederico Straggiotti Silva, por ser exemplo de integridade profissional e humana estando presente em todos os momentos da minha formação acadêmica e pessoal e por incentivar-me cada dia a superar as dificuldades;

Ao Marcus Antonio Pessanha Barreto por ser não simplesmente um colaborador, senão um amigo de coração, pela ajuda prestada neste trabalho e por todos os conselhos e ensino que sempre soube me dar;

Ao Dr. Rodrigo Costa Henriques, por abrir as portas do haras RH RANCH, por sua amabilidade em disponibilizar os animais e instalações para a realização deste trabalho, e aos seus funcionários, em especial ao Juninho por sua constante ajuda;

Aos Doutores da Banca examinadora do projeto e dissertação;

Aos meus Pais, Saul e Nelly por seu exemplo, incentivo, amor e ajuda incondicional;

Ao meu irmão Alex, à minha cunhada, Marisol e meus sobrinhos, Julian e Alejandra, por dar-me momentos de alegria;

Aos demais parentes que estão longe;

Aos meus amigos da Colômbia, Ana Lozano, Ana Cruz, Carlos, Eduardo, Eliana, Gabriel, Jordan, Manuel, que sempre se lembraram de mim e me deram força para continuar;

Aos que constantemente oraram por mim, para que eu seja abençoada e guardada de todo mal e perigo, especialmente aos meus amigos em Bogotá e Villavicencio;

A todos os que me ajudaram direta ou indiretamente, que seja Deus quem os abençoe;

Ao meu Deus, porque Ele sempre me guia, me guarda e me sustenta;

Obrigada Deus porque tens cumprido as Tuas promessas.

## **BIOGRAFIA**

JULI ANGÉLICA NARVÁEZ CANCEMANSI, filha de Saul Narváez Falla e María Nelly Cancemansi Ortiz, nasceu em 5 de março de 1985, na cidade de Villavicencio, Meta, Colômbia.

Em fevereiro de 2001, iniciou o curso de Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidad de los Llanos, na Colômbia, onde se formou em Julho de 2007. Em março de 2009, iniciou o Curso de Pós-graduação em Ciência animal, em nível de Mestrado na área de Reprodução Animal, da Universidade Estadual do norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ, submetendo-se à defesa de Dissertação para conclusão do curso em fevereiro de 2011.

*“Así que no depende del que quiere,  
ni del que corre, sino de Dios  
que tiene misericordia”.*

*Romanos 9:18*

## RESUMO

NARVÁEZ, J.A.C, M.V.Z, Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2011. Influência do recipiente de armazenamento (cilíndricos e planos) sobre sêmen equino criopreservado. Professor Orientador: José Frederico Straggiotti Silva. Co-orientador: Mauricio Fraga van Tilburg.

Foi avaliado o efeito de recipientes planos (FlatBag's) e cilíndricos (palheta e macrotubos) sobre os parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), funcionalidade e integridade de membrana em três tempos (0min, 30min e 60min) pós-descongelamento. Os parâmetros de motilidade e cinemática foram avaliados através de análise computadorizada (CASA). A funcionalidade de membrana plasmática foi avaliada mediante o uso do teste hiposmótico e a integridade de membrana plasmática através do teste com Iodeto de propídio (IP). Todas as amostras foram resfriadas a  $\pm 5^{\circ}\text{C}/20\text{min}$ , subsequentemente colocadas a 4cm acima do nitrogênio líquido por 10min e em seguida imersas neste. Todas as amostras foram descongeladas a  $37^{\circ}\text{C}/30\text{seg}$ . Foram congeladas 192 amostras de sêmen equino em palhetas de 0,5 mL (PAL0,5mL), macrotubos de 4 mL (MAC4mL), "FlatBag" de 0,5 mL (FB0,5mL) e "FlatBag" de 4 mL (FB4mL). Na análise de regressão das variáveis de motilidade e cinemática, o FB0,5mL teve o menor coeficiente linear, demonstrando queda mais rápida quando comparado com os outros recipientes. Dos recipientes planos, o FB4mL teve melhores resultados no tempo 60. O MAC4mL apresentou a pior funcionalidade e integridade de membrana quando comparado com a PAL0,5mL, entretanto, não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os recipientes planos e PAL0,5mL. No decorrer dos tempos, a PAL0,5mL mostrou-se melhor na maioria dos parâmetros avaliados, quando comparada com os outros recipientes. Desta forma, conclui-se que os tipos de recipientes e volumes utilizados tiveram influência sobre os resultados obtidos e que é provável que ao modificar as curvas de congelamento e descongelamento possa se obter melhores resultados nos recipientes planos.

**Palavras-chave:** Sêmen, Congelamento, FlatBag e Equino.



## ABSTRACT

This study evaluated the effect of flat containers (FlatBag's) and cylindrical (straws and maxi-straws) on the parameters of total motility (MT), progressive motility (MP), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), progressive velocity (VSL), in three times (0min, 30min and 60min) after thawing. The membrane integrity and functionality were evaluated only in the time 0min after thawing. Motility and kinematics parameters were evaluated by computerized analysis (CASA). The functionality of the plasma membrane was evaluated by use of the hypoosmotic test and plasma membrane integrity using propidium iodide (PI). All containers were cooled to  $\pm 5^{\circ}\text{C}/20\text{min}$  and subsequently placed 4 cm above the liquid nitrogen in a period of 10 minutes and then immersed in it. All samples were thawed at  $37^{\circ}\text{C}/30\text{seg}$ . 192 were frozen horse semen samples in 0.5 mL straws (PAL0, 5mL), 4mL maxi-straws (MAC4mL), 0.5 mL "FlatBag" (FB0,5mL) and 4mL "FlatBag" (FB4mL). In the regression analysis of variables of motility and kinematics, the FB0,5mL had the lowest coefficient linear, showing a decay rate faster than other containers. "Flatbags" assessed in this study, the FB4mL scored better in time 60. The MAC4mL had the worst functioning and membrane integrity, compared with PAL0,5mL, however, there was no statistical difference ( $p > 0.05$ ) between the containers plans and PAL0, 5mL. Over time, the PAL0,5mL proved to be better in most parameters compared with the other containers. Thus, we conclude that the types and volumes of containers used had influence on the results for each of the variables and that is likely to modify the curves of freezing and thawing can obtain better results in flat containers tested here.

**Key-words:** Semen, Freezing, FlatBag and Equine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Imagens de amostras de espermatozóides suínos congelados em palhetas.....	17
FIGURA 2 – Tipos de recipientes testados.....	36
FIGURA 3 – Motilidade total (%) em função do tempo de pós-descongelamento. Comparação de médias.....	40
FIGURA 4 – Análise de regressão da motilidade total (%) em função do tempo de pós-descongelamento em minutos.....	41
FIGURA 5 – Motilidade progressiva (%) em função do tempo de pós-descongelamento. Comparação de médias.....	42
FIGURA 6 – Análise de regressão da motilidade progressiva (%) em função do tempo de pós-descongelamento.....	43
FIGURA 7 – Velocidade curvilínea ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) em função do tempo de pós-descongelamento. Comparação de médias.....	44
FIGURA 8 – Análise de regressão da velocidade curvilínea ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) em função do tempo de pós-descongelamento.....	45
FIGURA 9 – Velocidade média do trajeto ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) em função do tempo de pós-descongelamento. Comparação de médias.....	46
FIGURA 10 – Análise de regressão da velocidade média do trajeto ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) em função do tempo de pós-descongelamento.....	47
FIGURA 11 – Velocidade progressiva ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) em função do tempo de pós-descongelamento. Comparação de médias.....	48
FIGURA 12 – Análise de regressão da velocidade progressiva ( $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) em função do tempo de pós-descongelamento.....	49
FIGURA 13 – Funcionalidade de membrana (%) nos recipientes de armazenamento. Comparação de médias.....	50
FIGURA 14 – Integridade de Membrana (%) nos recipientes de armazenamento. Comparação de médias.....	51

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 CONGELAMENTO DE SÊMEN.....	15
2.2 INJÚRIAS FÍSICAS E QUÍMICAS DURANTE O CONGELAMENTO .....	18
2.3 NUCLEAÇÃO DO GELO .....	20
2.3.1 Cristais de gelo intracelular.....	21
2.3.2 Cristais de gelo extracelular.....	22
2.3.3 Influência das substâncias na formação dos cristais de gelo e canais entre os cristais. ....	23
2.3.3.1 Proteínas anticongelantes. ....	23
2.4 SUBSTÂNCIAS CRIOPROTETORAS.....	24
2.4.1 Glicerol .....	25
2.4.2 Dimetilformamida .....	26
2.4.3 Dimetilsulfóxido (DMSO) .....	26
2.4.4 Etilenoglicol .....	27
2.4.5 Gema de ovo.....	28
2.5 RECIPIENTES DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN .....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 ANIMAIS.....	34
3.2 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO INICIAL DO SÊMEN.....	34
3.3 DILUIÇÃO DO SÊMEN E MÉTODO DE CONGELAMENTO.....	35
3.4 DESCONGELAMENTO DO SÊMEN .....	36
3.5 ANÁLISE COMPARATIVA.....	37
3.5.1 Motilidade e cinemática dos espermatozóides.....	37
3.5.2 Funcionalidade da membrana plasmática do espermatozóide .....	38

3.5.3 Avaliação da membrana plasmática .....	38
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1 MOTILIDADE .....	40
4.1.1 Motilidade Total (MT, %).....	40
4.1.2 Motilidade progressiva (MP, %) .....	42
4.2 CINEMÁTICA.....	44
4.2.1 Velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) .....	44
4.2.2 Velocidade média do trajeto (VAP, $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) .....	46
4.2.3 Velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) .....	48
4.3 INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DE MEMBRANA.....	50
4.3.1 Funcionalidade de Membrana.....	50
4.3.2 Integridade de membrana.....	51
5. DISCUSSÃO.....	53
5.1 MOTILIDADE .....	53
5.1.1 Motilidade total (MT).....	53
5.1.2 Motilidade progressiva (MP).....	54
5.2 CINEMÁTICA.....	55
5.2.1 Velocidade curvilínea (VCL) .....	55
5.2.2 Velocidade média do trajeto (VAP) .....	56
5.2.3 Velocidade progressiva (VSL) .....	57
5.3 INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DE MEMBRANA .....	58
6. CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS .....	71

## 1. INTRODUÇÃO

O crescente uso de sêmen criopreservado de garanhões para inseminação artificial (IA), tem incentivado a procura de melhores crioprotetores, diluentes, protocolos de congelamento e recipientes de armazenamento, com objetivo de manter as características seminais, garantindo assim a preservação e comercialização de sêmen de ótimas condições. Depois do processo de congelamento é comum a diminuição de algumas das características seminais tais como motilidade, integridade e viabilidade, o que afeta a fertilidade e causa perdas econômicas. O desenvolvimento de novos recipientes de armazenamento deve permitir manter as características espermáticas pós-descongelamento e facilitar sua utilização a campo, uma vez sendo o congelamento processado em volumes normalmente usados na realização de protocolos reprodutivos.

O entendimento do mecanismo do congelamento da célula espermática e a formação de cristais de gelo que causam danos mecânicos têm levado ao melhoramento dos protocolos de criopreservação; a pesquisa de crioprotetores menos lesivos ou combinações entre eles mais favoráveis (VIDAMENT *et al.*, 2002; HENRY *et al.*, 2002); adição de substâncias como insulina e aminoácidos ao meio crioprotetor seminal de garanhões (FAGUNDES *et al.*, 2010) e utilização de diferentes tipos de recipientes de armazenamento (BWANGA *et al.*, 1990; ERIKSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000 e EKWALLS *et al.*, 2007) que possam modificar a morfologia dos cristais. Segundo Eriksson e colaboradores (2000), foi observado um efeito positivo sobre a motilidade progressiva e a integridade da membrana de espermatozóides congelados em um novo recipiente de armazenamento conhecido como *FlatPack* (recipiente de envase plano) quando comparados com os tipos de envase tradicionais como as palhetas de 0,5 mL e 0,25 mL. Os pesquisadores atribuem este efeito positivo à melhor desidratação e à maior homogeneidade dos cristais, que está estreitamente relacionada com a forma do recipiente utilizado no congelamento; este tipo de recipiente plano permite com maior facilidade a expansão do líquido por ser mais flexível do que as palhetas.

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a influência dos tipos de recipientes de armazenamento sobre a motilidade, cinemática, integridade e funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides equinos pós-descongelados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONGELAMENTO DE SÊMEN

Muitas pesquisas têm demonstrado que não existe o diluente ideal em equinos. O sêmen de um mesmo garanhão pode responder de diferentes formas ao processo de criopreservação em uma mesma estação de monta, pois as características desse sêmen variam em um determinado tempo, podendo influenciar de forma positiva ou negativa a sobrevivência ou viabilidade pós-descongelamento, refletindo na taxa de prenhes e nos custos de produção de um haras. Segundo Graham (1996), a congelabilidade ruim dos espermatozóides pode ser melhorada pela alteração de alguma(s) etapa(s) do protocolo principal de criopreservação, demonstrando que é necessário reconhecer quais são as fases críticas do processo de criopreservação para cada um dos garanhões, o qual é um ponto a favor. Confirmando este postulado, Holt (2000) afirmou que existem diferenças na composição lipídica da membrana espermática entre espécies, raça e até em indivíduos da mesma espécie, sendo muito provável que esta seja a razão pela qual um mesmo diluente proporcione maior ou menor proteção aos espermatozóides de um indivíduo em particular.

A utilização do sêmen congelado equino oferece diversas vantagens para a equideocultura, tais como permitir o melhoramento e difusão das raças atuais por meio da utilização de sêmen de garanhões de alta genética, que possa ser armazenado por um grande período e possa resultar em prenhes. Porém, existem grandes dificuldades para o sucesso do congelamento de sêmen equino, pois as técnicas de preservação em baixas temperaturas causam lesões estruturais e funcionais dos espermatozóides como consequência do estresse térmico afetando sua fertilidade (MORTOS e BRUCE, 1989; JASKO, 1994) e motilidade, como consequência do aumento de injúria na estrutura da membrana (QUINN *et al.*, 1969; NATH, 1972, citados por BYRNE *et al.*, 2000). A fertilidade do sêmen congelado é inferior à do sêmen fresco em programas de inseminação artificial na maioria das espécies e pode ser apenas parcialmente compensada, ao utilizar grandes concentrações de espermatozóides por dose inseminante (WATSON, 1995).

Segundo Eriksson e colaboradores (2002), os métodos correntes de congelamento e descongelamento não têm mostrado os melhores resultados; quando uma amostra de sêmen é processada, muitos espermatozóides perdem sua viabilidade durante o resfriamento, centrifugação, congelamento e descongelamento. Eles constataram também que, em suínos, a centrifugação pode produzir aproximadamente 20 a 25 % de perdas dos espermatozóides viáveis, esta perda é devida à força centrífuga aplicada às células espermáticas, que tem um efeito negativo sobre a viabilidade.

Takamatsu *et al.* (1999) observaram a formação extracelular de cristais de gelo como resposta celular ao congelamento, sendo este o principal estresse físico. Durante o congelamento formam-se canais, dentre os quais todo o soluto e materiais em suspensão, incluindo células ficam concentrados. Com a subsequente redução da temperatura, as células são expostas de modo crescente a soluções concentradas, continuando até que a solução concentrada fique cristalizada ou vitrificada. (MORRIS *et al.*, 1999).

Geralmente os protocolos de criopreservação são desenvolvidos com taxas de resfriamento lentas e, conseqüentemente, a maior parte de água livre é retirada da célula e imediatamente da solução, permanecendo no meio extracelular em forma de cristais de gelo (EKWALL *et al.*, 1997). Por isso, mais de 80% da água livre está presente nos cristais de gelo extracelulares comprimindo fortemente os espermatozóides desidratados adjacentes ao soluto, em canais estreitos com dimensões variáveis. Com isso, existe certa proporção de resíduo de água nesses canais que vão determinar como a alta concentração de soluto circundará o espermatozóide. A variação no tamanho desses canais pode estar relacionada à concentração do soluto (HERNÁNDEZ *et al.*, 2007). Figura 1.



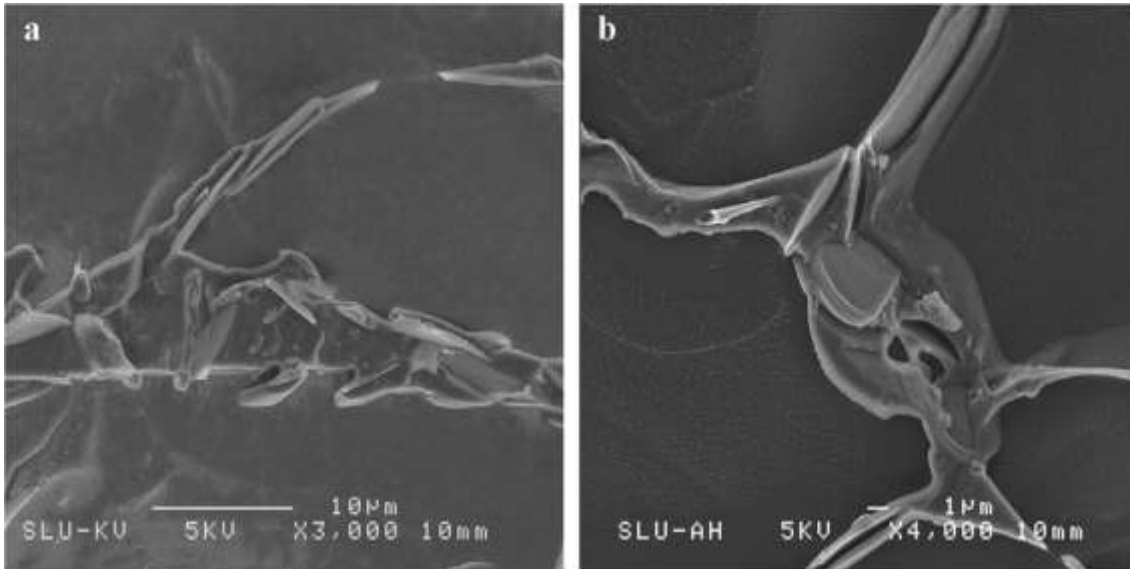


Figura 1. (a-b) Imagens (Microscópio Cryo-SEM) de amostras de espermatozóides suínos congelados em palhetas de 0,5mL. (a) A maioria dos espermatozóides está localizada em canais de alta concentração de soluto que separa os cristais de gelo (3000x). (b) Imagem detalhada de uma célula espermática capturada pela matriz do diluente congelado (4000x), não sendo evidentes danos externos (HERNÁNDEZ et al., 2007).

Os resultados de experimentos feitos por Mazur e colaboradores (MAZUR & COLE, 1989; SCHNEIDER & MAZUR, 1987; e MAZUR, *et al.*, 1981) nos quais as células foram congeladas lentamente em soluções com osmolaridade iniciais diferentes, mostram que durante o congelamento, em uma dada temperatura, a percentagem relativa de fluido e gelo é uma função da osmolaridade inicial da solução; essa percentagem foi chamada por eles “fração não congelada”. Por meio desses experimentos, eles mostraram que, durante o congelamento lento, a sobrevivência celular, em qualquer temperatura, é mais dependente da magnitude da fração não congelada do que da concentração de sais na solução extracelular. Segundo Mazur e seus colaboradores (1981), isso demonstra que a dominância do mecanismo de danos durante o congelamento com baixas taxas de resfriamento é de natureza “reológica”, relacionado com a interação entre célula na fração não congelada e gelo, e esta é atribuída à força cortante do gelo ou deformidade da célula.

Uma particularidade da característica físico-química da água é sua tendência a se expandir quando congelada. Esse fenômeno de expansão é limitado pela palheta quando ele ocorre dentro da mesma. Como consequência disso, os cristais de gelo extracelulares são empurrados em direção ao centro da palheta, causando

ainda maior compressão às células que ficam nos canais. Courtens e Rety (2001) observaram maior número de lesões no acrossoma e membranas em espermatozoides de carneiros e varrões localizados no centro da palheta, mesmo não tendo sido observado cristais de gelo intracelulares quando congelados em palhetas convencionais.

A nucleação de gelo é um evento estocástico e pode ocorrer próximo ao ponto de congelamento ou mais que 10 a 20 °C abaixo dessa temperatura durante os métodos convencionais usados para o congelamento de sêmen (SONGSASEN *et al.*, 1997). Além disso, mesmo amostras em iguais condições de congelamento podem ter diferentes temperaturas de nucleação e estruturas diferentes de cristais de gelo quando a nucleação de gelo não é controlada (SEARLES *et al.*, 2001).

As estruturas dos cristais de gelo são essencialmente fixadas pela temperatura de nucleação do gelo em palhetas resfriadas abaixo do ponto de congelamento (MORRIS *et al.*, 1999), o qual está relacionado com a recuperação das células no descongelamento, sendo considerado, portanto, o maior fator na variação entre mesmas amostras durante a criopreservação (WOELDERS *et al.*, 2005).

## 2.2 INJÚRIAS FÍSICAS E QUÍMICAS DURANTE O CONGELAMENTO

É conhecido que o processo de criopreservação do sêmen causa danos subletais às células e, subsequentemente, reduz a fertilidade. A membrana plasmática serve como a principal barreira ao meio exterior e é o lugar primário de dano no congelamento-descongelamento. Entre os danos causados podem-se incluir desestabilização de membrana devido ao rearranjo dos lipídeos, perda dos lipídeos da membrana e peroxidação dos lipídeos da membrana como resultado da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Segundo Holt (2000), esses eventos podem afetar a motilidade espermática, as respostas ao estresse mecânico e as vias de sinalização, como resultado a habilidade para atingir, ligar-se e reagir com a zona pelúcida são comprometidas.

Diferentes pesquisas na área da criobiologia são dirigidas com a finalidade de entender os mecanismos de danos celulares durante o congelamento e

descongelamento. Tem-se, aceito nesse campo, que são dois os mecanismos pelos quais se produz dano celular: químico (consequente da desidratação celular durante o congelamento com baixas taxas de resfriamento) e físicos (pela formação de cristais de gelo intracelular durante o congelamento com altas taxas de resfriamento) (MAZUR, 1970). Lovelock (1953) demonstrou os danos celulares por mecanismo químico através de estudos com hemácias expostas a soluções hipertônicas. Durante o congelamento celular, ele observou que os danos ocorrem pela progressiva formação de gelo no meio exterior, com consequente aumento progressivo da concentração da solução extracelular. Os danos causados pela solução extracelular hipertônica poderiam ser químicos ou relacionados com a taxa de osmolaridade, influenciando o volume celular (MERYMAN, 1971 e STEPONKUS & GORDON-KAMM, 1985).

A maior parte dos pesquisadores acredita que o mecanismo de danos durante o congelamento com baixas taxas de resfriamento está correlacionado com a formação de uma solução hipertônica extracelular. Entretanto, vários cientistas têm desafiado essa teoria. Em 1967, Nei e colaboradores postularam que as células são danificadas por interação mecânica entre a fase de desenvolvimento dos cristais de gelo e consequentemente por sua localização entre esses cristais (NEI, 1967; NEI & TANNO, 1968). Eles observaram que hemácias congeladas entre -2 e -10°C apresentaram alta taxa de hemólise em relação a hemácias expostas em concentrações similares de cloreto de sódio (NaCl) nestas temperaturas, mas na ausência de cristais de gelo extracelular (NEI & TANNO, 1968). Com essas observações, Nei e Tanno concluíram que os danos durante o congelamento lento não poderiam ser atribuídos apenas à exposição a altas concentrações de soluto e que os danos mecânicos são uma causa significativa de hemólise em hemácias.

Depois da invenção do criomicroscópio de solidificação direcional por Rubinsky (1985), promoveram estudos para entender o mecanismo de danos durante o congelamento. Rubinsky e Lkeda (1985) concluíram que o gradiente de temperatura da interface de congelamento e a velocidade da interface de congelamento são as duas maiores variáveis térmicas fundamentais que compõem a “taxa de resfriamento”, que é o parâmetro térmico comumente usado na criobiologia para correlacionar a viabilidade celular com o histórico térmico durante o congelamento. Com o uso do microscópio de solidificação direcional, eles mostraram que, variando a velocidade da interface de congelamento e o gradiente

de temperatura, é possível congelar células com várias taxas de resfriamento e, conseqüentemente, com diferentes formas de cristais de gelo. Beckman *et al.*, (1990) e Hubel *et al.*, (1992) mostraram que, para mesma taxa de resfriamento, a viabilidade celular pode variar com a forma dos cristais de gelo, portanto, afetando o mecanismo de interação célula-gelo durante o congelamento.

Takamatsu e Rubinsky (1999) desenvolveram um procedimento experimental para estudar o efeito da compressão dos cristais de gelo na viabilidade celular. Utilizando células cancerígenas de adenoma primário de próstata humana, mostraram que a viabilidade celular decrescia vertiginosamente quando as células eram comprimidas até 30% do seu tamanho original. Um simples modelo matemático mostrou que a temperatura no qual o efeito da compressão pode causar danos na célula está relacionada com o espaço entre os cristais de gelo.

### 2.3 NUCLEAÇÃO DO GELO

A estrutura dos cristais de gelo é essencialmente fixada pela temperatura de nucleação do gelo nas palhetas super-resfriadas (MORRIS *et al.*, 1999). Como a nucleação não é controlada, as mesmas amostras que são resfriadas com curvas idênticas apresentam diferenças entre si, devido a diferentes temperaturas de nucleação e, conseqüentemente, diferentes estruturas de cristais de gelo (SEARLES *et al.*, 2001). Isso modifica a recuperação de células viáveis entre amostras de uma mesma partida seminal no descongelamento e é considerado o maior fator de variação entre mesmas amostras durante o congelamento (WOELDERS *et al.*, 2005). Songsasen *et al.* (1997) e Woelders *et al.* (2005) sugeriram que a forma de controlar as diferentes temperaturas de nucleação e as diferentes estruturas de cristais de gelo em uma amostra é por meio do “*seeding*”, que permite a indução da formação de cristais de gel extracelular depois do ponto de congelamento, eliminando as arbitrariedades da nucleação do gelo e levando a condições de congelamento mais controladas. Nessas condições, as estruturas dos canais usualmente seguem um congelamento e solidificação linear da fração de gelo, resultando em um arranjo uniforme dos canais, que parece ser benéfico para a criosobrevivência espermática (MORRIS *et al.*, 1999).

O “*seeding*” em amostras de sêmen super-congeladas parece ser benéfico para a sobrevivência dos espermatozóides após o congelamento (HERNANDEZ *et al.*, 2007). Espermatozóides humanos foram congelados convencionalmente em grupos com e sem a nucleação do gelo induzida pelo “*seeding*”. Houve aumento significativo da motilidade espermática após o descongelamento no grupo induzido a “*seeding*” em relação ao grupo controle (MORRIS *et al.*, 1999). Kumar *et al.* (2003) constataram o efeito benéfico do “*seeding*” no congelamento na sobrevivência espermática após o descongelamento de palhetas de 0,5 mL. O uso de glicerol como crioprotetor, que aumenta o super congelamento e altera a morfologia do gelo de hexagonal para formas irregulares é outro fator que pode alterar a forma dos cristais de gelo (SEARLES *et al.*, 2001).

### **2.3.1 Cristais de gelo intracelular**

Para minimizar a duração da exposição do espermatozóide às diferentes situações de estresse do congelamento e, assim, proporcionar ótima sobrevivência, é necessário um ritmo de congelamento rápido e também um tempo suficiente para permitir que a água possa sair da célula por osmose evitando a formação de gelo intracelular, letal para o espermatozóide (WATSON, 2000).

Dado que a formação de gelo intracelular é dependente do ritmo do congelamento e descongelamento. Um estreito controle do ritmo de diminuição e aumento da temperatura pode minimizar as lesões celulares causadas pelo gelo intracelular. Se a taxa de congelamento é extremamente rápida, o gelo intracelular constitui microcristais e os danos derivados são reduzidos (AMANN e PICKETT, 1987). O sucesso de um procedimento de criopreservação está condicionado pelo processo de descongelamento, portanto, se a taxa de resfriamento é rápida, a de aquecimento também deve ser; alternativamente, se a taxa de resfriamento é lenta, também deve ser a de aquecimento. As células que contêm microcristais de gelo intracelulares devem ser reaquecidas rapidamente a fim de evitar a re-cristalização destes pequenos cristais, que podem lesar as células (AMANN e PICKETT, 1987).

Quando se realiza congelamento lento, grande quantidade de água migra do interior da célula até o meio extracelular, na tentativa de reverter os danos do efeito

hipertônico da solução. Neste caso, é importante que o descongelamento seja também lento, para que os volumes de água sejam reequilibrados antes do completo descongelamento, evitando que grandes alterações do volume celular provoquem lesão da membrana espermática. Por outro lado se o congelamento se dá rapidamente, não ocorre uma grande alteração no volume de água no interior da célula e microcristais de gelo serão ali formados (MAZUR, 1984).

Se o congelamento ocorre rapidamente, o descongelamento deverá ser rápido, pois se este é realizado de forma lenta a água intracelular se descongela em um momento em que existe ainda temperatura baixa o suficiente para haver uma recristalização da água recém-descongelada. Se isto acontecer, grandes cristais, como consequência da recristalização formar-se-ão, expondo a célula ao risco de sofrer perfurações por estes grandes cristais de gelo (WATSON, 1995 e HOLT, 2000).

### **2.3.2 Cristais de gelo extracelular**

Qualquer tipo de dano espermático durante o processo de resfriamento será acentuado durante o processo de congelamento e descongelamento. As principais fontes de injúrias durante o processo de criopreservação incluem a formação de cristais de gelo intra e extracelulares (AMANN e PICKETT, 1987).

Quando uma suspensão espermática é resfriada abaixo de 5°C, inicialmente as células espermáticas e o meio que as envolve permanecem descongelados. Entre -5°C e -15°C, começa a formação de cristais de gelo no meio diluidor e as células espermáticas continuam resfriadas. A membrana plasmática atua como barreira, impedindo a expansão dos cristais de gelo do meio extracelular ao compartimento intracelular; à medida que a água extracelular se congela, os sais excluídos dos cristais de gelo se acumulam em concentrações crescentes no líquido ainda não congelado, aumentando o gradiente osmótico no meio extracelular, provocando a difusão da água intracelular ao ambiente extracelular, causando a desidratação das células espermáticas (AMANN e PICKETT, 1987). Assim, a desidratação osmótica, mas do que a formação de gelo intracelular é a principal causa das alterações ultra-estruturais da membrana e uma das suas consequências é

a perda da seletividade da membrana (PARKS E GRAHAM, 1992, citados por NASCIMENTO *et al.* 2008).

Ambas as formas de resfriamento causam danos celulares. Assim, a velocidade de resfriamento ideal deveria ser lenta o suficiente para evitar a formação de cristais de gelo intracelulares, mas de certa forma rápida para diminuir o efeito solução (HOLT, 2000).

### **2.3.3 Influência das substâncias na formação dos cristais de gelo e canais entre os cristais.**

#### **2.3.3.1 Proteínas anticongelantes.**

As proteínas anticongelantes são compostos que podem modificar a morfologia do gelo sem qualquer mudança significativa na osmolaridade da solução, tendo sido usadas para produzir mais evidências que a estrutura dos cristais de gelo pode executar como um importante papel na destruição da célula congelada. Rubinsky e Devries (1989) congelaram hemácias em soluções crioprotetoras contendo glicerol com e sem proteínas anticongelantes. A concentração de proteína anticongelante foi de 20 mg/mL, que não poderia gerar mudanças na osmolaridade da solução. Em outro controle, a concentração de proteína anticongelante foi suficiente para mudar completamente a estrutura dos cristais de gelo para a forma de espículas, semelhante à estrutura de agulhas com 10 µm de diâmetro e separadas a 10 µm uma das outras. Quando hemácias foram congeladas na ausência de proteínas anticongelantes sobreviveram ao congelamento, enquanto que na presença dessas proteínas foram completamente destruídas, implicando na mudança da morfologia do cristal de gelo e conseqüentemente no mecanismo de destruição das células.

Estudos realizados por Ishiguro e Rubinsky (ISHIGURO & RUBINSHKY, 1994 e 1998) constataram que a morfologia do cristal de gelo pode estar implicada na destruição das hemácias pelo congelamento. O congelamento das hemácias em platina de microscópio de solidificação direcional demonstrou que o gelo empurra

fisicamente as células dentro dos canais que são formados entre os cristais de gelo. Imagens das hemácias congeladas na presença de proteínas anticongelantes mostram que as mesmas foram deformadas pelas espículas de gelo que, por fim, destruíram as células. Também eles observaram que na presença de glicerol, os cristais não empurram as células, mas crescem à sua volta. Pelo qual é possível considerar que o glicerol pode ter um efeito protetor na célula também pela sua habilidade de modificar o modo de crescimento dos cristais de gelo.

Trabalhos têm demonstrado que células foram destruídas pelo congelamento quando a concentração de proteínas anticongelantes na solução foi suficientemente alta para modificar a estrutura dos cristais de gelo para forma de espículas e, quando essas concentrações foram baixas, as células não eram destruídas (KOUSHAFAR *et al.*, 1997; KOUSHAFAR e RUBINSKY, 1997 e PHAM *et al.*, 1999). Em resumo, quando as proteínas anticongelamento foram usadas em quantidade que produzissem pequenos cristais de gelo, as células congeladas foram destruídas em proporções maiores do que seriam originalmente destruídas em condições térmicas e químicas semelhantes. Registros visuais do processo de congelamento mostraram células sendo deformadas entre pequenos cristais de gelo causados pela presença de proteínas anticongelantes, e envolve cristais de gelo causando deformação equivalente ao mecanismo de danos que acontecem comumente durante o congelamento (ISHIGURO & RUBINSKY, 1998; ISHIGURO & RUBINSKY, 1994; KOUSHAFAR & RUBINSKY, 1997).

## 2.4 SUBSTÂNCIAS CRIOPROTETORAS

Os crioprotetores são incluídos no diluente com objetivo de proteger os espermatozoides durante o congelamento e o descongelamento. Dividem-se em duas classes: penetrantes e não-penetrantes. Os crioprotetores penetrantes são aqueles que passam através da membrana espermática e atuam tanto intracelularmente quanto extracelularmente. Os crioprotetores não-penetrantes atuam unicamente no meio extracelular (GRAHAM, 1995).

Dentre os crioprotetores penetrantes, se incluem glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, propanodiol, butanodiol, metanol e amidas como a



dimetilformamida. Eles se comportam como solventes e possuem o ponto de congelamento muito mais baixo do que o da água. Quando o diluente congela, a água pura congela e forma cristais de gelo. Entre estes cristais de gelo ficam canais de diluidor não congelado, no qual os espermatozóides ficam alojados (GRAHAM, 1995).

Os crioprotetores não penetrantes incluem proteínas presentes no leite e ovo; açúcares como a lactose, frutose, manose, rafinose ou trealose; polímeros sintéticos como o polivinilpirrolidona ou metil-celulose. Eles promovem a desidratação celular durante o congelamento, atuando no mecanismo osmótico, impedindo a formação de grandes cristais de gelo no interior da célula (PEÑA, 1997 e HOLT, 2000).

#### **2.4.1 Glicerol**

É o crioprotetor penetrante mais usado e considerado como crioprotetor universal desde 1949, quando Polge *et al.* (1949) demonstraram a eficácia deste no congelamento de sêmen. O glicerol é altamente solúvel em água e rapidamente penetra a bicamada lipídica da membrana plasmática (SCHERZER *et al.*, 2009). Sua ação protetora está relacionada com suas propriedades coligativas e ligantes da água, diminuindo o ponto crioscópico intracelular. Como consequência, aumenta a quantidade de água que permanece no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos e reduzindo os danos do efeito de solução (PEÑA, 1997 e HOLT, 2000). Apesar disso, há evidências de que o glicerol é tóxico, pois causa injúrias bioquímicas resultantes da ação direta sobre os componentes celulares (GRAHAM, 1995).

A primeira consequência da adição do glicerol em um meio isotônico é uma alteração de volume celular devido a uma rápida saída de água intracelular (enrugamento celular), seguido de um lento retorno ao volume original à medida que o crioprotetor penetra na célula (HAMMERSTED e GRAHAM, 1990 e PEÑA, 1997). O glicerol pode alterar as propriedades básicas da membrana plasmática por induzir mudanças no acondicionamento de fosfolipídios e, ainda, alterar a estabilidade e a permeabilidade a água. Estas mudanças podem contribuir para a diminuição da

sobrevivência espermática, posterior ao processo de congelamento–descongelamento e acelerar a capacitação espermática (WATSON, 1995).

Estudos realizados por Alvarenga *et al.* (2000) demonstraram que a utilização do etilenoglicol oferecia as mesmas propriedades crioprotetoras que o glicerol; enquanto Henry *et al.* (2002) confirmaram estes resultados e observaram que eles poderiam ser utilizados associados ou separados. Vidament *et al.* (2002) concluíram que a utilização combinada de glicerol e dimetilformamida tem melhores resultados do que a utilização isolada.

#### **2.4.2 Dimetilformamida**

A dimetilformamida é um crioprotetor penetrante que tem sido considerado como uma recente alternativa para evitar lesão do espermatozóide equino com resultados superiores ao glicerol (GRAHAM, 2000; ALVARENGA, 2002; VIDAMENT *et al.*, 2002 e MOFFET *et al.*, 2003), especialmente em casos de espermatozoides provenientes de garanhões que são sensíveis ao processo de congelamento (ALVARENGA *et al.*, 2005). Segundo Medeiros *et al.* (2002), a concentração de 5% v/v ou 0,6 e 0,9M de dimetilformamida é a mais indicada para uso em diluentes para espermatozoides equinos.

Segundo Moffet *et al.* (2003), a dimetilformamida tem menor peso molecular comparada com o glicerol; o que potencialmente resulta em maior facilidade para atravessar as membranas espermáticas, um menor tempo de equilíbrio entre os compartimentos extra e intracelular e, como consequência, na redução do potencial lesivo do choque osmótico.

#### **2.4.3 Dimetilsulfóxido (DMSO)**

Este crioprotetor permite a fusão das membranas a uma temperatura aproximada a 0°C, impedindo a difusão dos cátions e outras substâncias

intracelulares através das rupturas da membrana causada pela formação intracelular de gelo (SHIER, 1988). Também têm sido utilizados em criopreservação de sêmen coelhos e elefantes com bons resultados, e em equinos considerados ruins congeladores, mostrou melhores valores de motilidade e viabilidade pós-descongelamento quando comparado com glicerol (WATSON, 1995). Segundo Chenier *et al.* (1998), relataram que não houve diferença significativa de congelabilidade entre glicerol, etilenoglicol e DMSO, embora o DMSO tenha melhorado características pós-descongelamento, quando comparado aos outros tratamentos.

#### **2.4.4 Etilenoglicol**

É um poli-álcool ( $C_2H_6O_2$ ), com peso molecular (62,07) e inferior ao do glicerol (92,10) e é muito utilizado na criopreservação de tecido ovariano e de embriões de diferentes espécies, por sua baixa toxicidade, elevada permeabilidade fazendo com que penetre a membrana plasmática da célula com maior rapidez e facilidade do que o glicerol (MASSIP, 2001). Segundo Alvarenga *et al.* (2000), as propriedades crioprotetoras do etilenoglicol têm sido semelhantes às do glicerol, no congelamento de sêmen equino, quanto à preservação da motilidade e integridade de membrana. Também, Cotorello *et al.* (2001) testaram o efeito do etilenoglicol, isolado ou associado ao glicerol, na criopreservação do sêmen equino e não observaram diferença entre os tratamentos testados. Segundo Henry *et al.* (2002), o etilenoglicol poderia substituir o glicerol, quando utilizado a uma concentração de 3%, ou inclusive mais baixa, e pode-ser utilizado isolado ou associado com glicerol, proporcionando bons resultados na motilidade progressiva e na preservação da integridade de membrana e acrossoma. Outros trabalhos realizados em garanhões da raça Mangalarga Marchador demonstraram que o etilenoglicol foi superior ao glicerol em preservar a integridade estrutural dos espermatozóides equinos (SNOECK, 2003).

#### 2.4.5 Gema de ovo

Segundo Mann *et al.* (2008), a gema está constituída por aproximadamente 48% de água, 33% de lipídeos e 17% de proteínas; é fonte de vitaminas, minerais, imunoglobulinas, albumina e enzimas antioxidantes como superóxido dismutase e glutathione peroxidase.

A gema de ovo é utilizada em concentrações de 10 a 20 % V/V, variando em alguns casos, sendo utilizada para proteger os espermatozóides do choque frio. Provavelmente, esta proteção seja fornecida pela presença dessas lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (BERGERON & MANJUNATH, 2006). Varella e colaboradores (2004) propuseram a utilização apenas das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes na gema de ovo ou outro tipo de fonte de lipídios, para a conservação de sêmen, evitando assim o uso de produtos de origem animal, que representam risco potencial de contaminação ao sêmen, os quais não têm uma composição uniforme.

Embora o mecanismo exato de proteção por parte da gema de ovo ainda não esteja elucidado existem hipóteses que têm sido sugeridas para explicar seu possível mecanismo de proteção, e entre elas estão, primeiramente, a associação de LDL à membrana espermática estabilizando-a, mas esta é contraditória ao relacionar a estabilidade da associação de LDL com a membrana espermática; a segunda hipótese é formação de uma película protetora (constituída de fosfolipídios presentes nos LDL) sobre a membrana espermática ou por reposição de fosfolipídios da membrana que se perdem ou são danificados durante o processo de criopreservação. Um recente estudo mostrou que fosfatidilcolina contida nos LDL da gema de ovo ou do óleo de soja se associa com a membrana espermática equina e protege esta eficientemente, mas esses fosfolipídios não são incorporados à membrana espermática depois da criopreservação (RICKER *et al.*, 2006); a terceira hipótese consiste na competição das LDL por lugares de ligação na membrana com peptídeos deletérios (<5 kDa) do plasma seminal (BERGERON & MANJUNATH, 2006).

Segundo Bergeron e Manjunath (2006), estes peptídeos deletérios pertencem a uma família de proteínas ligadoras de lipídios (proteínas BSP), descobertas inicialmente em plasma seminal bovino e posteriormente suas homólogas em outras

espécies de mamíferos como suínos, equinos, caprinos, ovinos. No bisão, proteínas homólogas a estas, foram isoladas a partir de secreções da vesícula seminal. As proteínas BSP são secretadas pela vesícula seminal do bovino e representam aproximadamente 65% das proteínas totais do plasma seminal, mas sua concentração varia de espécie a espécie. Quando em contato, as proteínas BSP ligam-se aos lipídios da membrana espermática e estimulam a remoção destes (colesterol e fosfolipídios) da membrana espermática. Quando o sêmen está diluído, em diluente com gema de ovo, esses fatores deletérios do plasma seminal interagem com as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes na gema de ovo. Essa interação (proteínas BSP:lipoproteínas) minimiza a remoção de lipídeos da membrana espermática, influenciando positivamente o armazenamento, diminuindo os efeitos adversos da criopreservação e, conseqüentemente, funções como a motilidade, integridade acrossomal e viabilidade são mantidas. Deste modo, o LDL pode oferecer proteção pela redução dos efeitos deletérios das proteínas do plasma seminal sobre a membrana espermática. Bergeron *et al.* (2004), observaram que quando o sêmen era diluído com um extensor com gema de ovo ou LDL, aproximadamente 80% menos das proteínas de BSP eram associadas com os espermatozoides e concomitantemente, a saída de lipídeos (colesterol e fosfolipídios) da membrana espermática foi prevenida durante o armazenamento. Se o sêmen não é diluído, os espermatozoides são expostos continuamente a altas concentrações de proteínas BSP, e a remoção de lipídeos é progressiva, resultando em uma diminuição da resistência dos espermatozoides ao choque térmico e congelamento.

## 2.5 RECIPIENTES DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

Desde que Merkt e Krause (1966) e Nagase *et al.* (1966) reportaram os primeiros casos de prenhes e nascimentos de produtos a partir da utilização de sêmen processado em forma de *pellets* ou gotículas de sêmen diluído congelado sobre gelo seco, utilizando a técnica descrita por Nagase e Niwa (1964), a criopreservação de sêmen equino tem tomado maior importância. Na mesma década, Bader e Mahler (1968) e Oshida *et al.* (1968) registraram resultados

utilizando a mesma técnica (HELLEMAN e LINDEMANN, 1981). Como consequência dos riscos de contaminação, dificuldade de identificação, armazenamento, manipulação e descongelamento dos *pellets*, esta técnica não foi utilizada com maior frequência (ERIKSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

Knoop (1968) e Rajamanan *et al.* (1968) utilizaram ampolas de 10 mL e Schafer e Baum (1970) de 100 mL, como resultado foi observado que o congelamento de sêmen em grandes volumes estava relacionado com baixas porcentagens de sobrevivência espermática. Estes resultados incentivaram Ellery *et al.* (1971) a envasar 10 mL de sêmen em sacolas plásticas de 5 por 15 cm, com uma espessura de aproximadamente 0,7 mm. Este recipiente permitiu a otimização da relação volume/superfície, melhorando as taxas de sobrevivências espermáticas; se convertendo assim no primeiro reporte de utilização de recipiente plástico plano (sacolas plásticas) (HELLEMAN e LINDEMANN, 1981).

Uma relação de grande superfície e volume pequeno, é característico do recipiente de armazenamento plano (sacolas plásticas). Este apresenta extensa superfície de contacto para armazenar pequeno volume de sêmen (BWANGA *et al.*, 1990). Tem se obtido aceitável motilidade e fertilidade pós-descongelamento, utilizando sacolas plásticas com volume de 5 mL (LARSSON *et al.* 1976; BWANGA *et al.* 1991; MWANZA e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1993; citados por ERIKSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000). No caso de sêmen suíno, este deve ser re-diluído após o congelamento, para obter uma dose com volume ideal para a inseminação artificial, portanto, causando maiores lesões na membrana e diminuindo assim, sua capacidade fertilizante (ORTMAN e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1994).

Em um estudo feito por Eriksson e Rodriguez-Martinez (2000a), foi congelado sêmen suíno, em sacolas plásticas grandes denominadas “*cochettes*” e macrotubos. Os resultados observados demonstraram que a motilidade pós-descongelamento nos “*cochettes*” foi melhor do que nos macrotubos, mas em relação à integridade de membrana, os macrotubos demonstraram ser melhores do que os “*cochettes*”. Eles atribuíram estes resultados a que os “*cochettes*” utilizados neste estudo eram muito flexíveis e dificultaram o esvaziamento total do ar, ficando preso internamente e impedindo o descongelamento rápido, o que favoreceu à re-cristalização de gelo, ou seja, a formação de novos cristais a partir de água em processo de descongelamento, lesando, assim, as membranas. Segundo eles, o procedimento de congelamento-descongelamento pode ser eficaz para manter a

motilidade, mas pode não ser para manter a integridade da membrana, este fato devido possivelmente a que, tanto o compartimento da cabeça (relacionado à integridade de membrana plasmática e de acrossoma), quanto da peça intermédia e cauda (relacionado com motilidade) têm diferentes condições de congelamento e descongelamento.

O *FlatPack*, outro recipiente de armazenamento plano feito com plástico, foi desenvolvido por Eriksson e Rodriguez-Martinez (2000a). É uma sacola plástica plana, feita a partir de polietileno tereftalato (PET); suas dimensões são: 0,2 mm de espessura, 30 cm de comprimento e 22 mm de largura; quando este é enchido com 5 mL de sêmen, sua espessura chega a 1 mm. O *FlatPack* foi utilizado para congelar sêmen suíno, contendo uma dose inseminante e, por suas dimensões, de fácil armazenamento, pois este cabe em um caneco de um botijão convencional. Estes pesquisadores testaram e compararam diferentes taxas de congelamento e descongelamento em sêmen armazenado em macrotubos e *FlatPacks*, avaliando sua influência sobre a motilidade e integridade de membrana. Também foram monitoradas mudanças de temperatura intra-envase durante o congelamento e descongelamento. Eles observaram que os valores de motilidade, velocidade e deslocamento lateral de cabeça dos espermatozóides congelados em *FlatPacks* foram superiores a aqueles que foram congelados em macrotubos. Também foi observada diferença substancial entre a temperatura intra-envase do centro e da periferia do macrotubo, o que não aconteceu no *FlatPack*. Este melhoramento visto parece estar relacionado com a rapidez do congelamento-descongelamento e a homogeneidade da temperatura da amostra, não havendo diferenças de temperaturas dentro da mesma. Contrário a este, as diferenças de temperatura entre o centro e periferia do macrotubo no processo de congelamento e quase sempre durante o descongelamento, permitem a formação de gelo intra ou extracelular a partir de água já descongelada, evento conhecido como re-cristalização. A recristalização traz como consequência lesão de membranas (FISER e FAIRFULL, 1990) e forma microcristais nas mitocôndrias (COURTENS e PAQUIGNON, 1985), afetando a motilidade pós-descongelamento. Este fato foi observado nos espermatozóides congelados em macrotubos (FISER e FAIRFULL, 1990).

O efeito mecânico que gera dano na criopreservação foi mostrado pela primeira vez por Nei (1967 e 1968) citado por Saragusty *et al.*, (2009), que comprovaram que os cristais de gelo produziam dano celular por interação mecânica

com as células que ficavam presas entre eles. Anos depois este postulado foi denominado a “hipótese da fração não congelada” (MAZUR *et al.*, 1981). Os últimos estudos confirmam o anterior e concluem, que a diminuição no espaçamento entre os cristais pode, realmente, causar destruição celular (ISHIGURO e RUBINSKY, 1994; TAKAMATSU e RUBINSKY, 1999; citado por SARAGUSTY *et al.*, 2009). Saragusty e colaboradores (2009) mencionaram outros possíveis mecanismos de lesão que foram anteriormente pesquisados por outros autores, entre eles estão: O contato e interação entre o gelo e a bicamada lipídica (WOLFE e BRYANT, 2001), imersão das células pelo crescimento dos cristais em função da velocidade de congelamento e composição da solução (HUBEL *et al.*, 2007), e interação célula-célula denominada como “efeito de envase” (PEGG e DIAPER, 1988 e PEGG *et al.*, 1984).

A técnica de solidificação direcional utiliza o “*seeding*” para alcançar velocidade constante através de um gradiente de temperatura linear. Como consequência, o crescimento dos cristais de gelo pode ser controlado, melhorando sua morfologia. Um gradiente de temperatura linear se consegue utilizando uma grande superfície de armazenamento, pois esta permite que o calor seja eficientemente dissipado desde a amostra até o meio circundante. Portanto, o congelamento em recipientes planos de grande superfície minimiza o dano das células, mostrando melhores resultados em viabilidade, integridade de acrossoma e funcionalidade de membrana do que o tradicional congelamento em palhetas de pequenos volumes (ARAV, 1999; ARAV *et al.*, 2002; SARAGUSTY *et al.*, 2007; citados por SARAGUSTY *et al.*, 2009). Em estudos feitos para comprovar o anterior postulado, eles introduziram pequenas esferas de vidro no recipiente de congelamento, para aumentar a superfície de contato dos espermatozóides. Foi demonstrado que, quanto maior a área de superfície com que as células entraram em contato, maior foi o dano, possivelmente porque as células ficaram comprimidas entre os cristais e a superfície. Neste mesmo estudo, foi avaliada a pressão intra-envase e foi demonstrado que pequenos volumes em um recipiente rígido, apresentam maior pressão do que aqueles congelados em recipientes planos. Estes resultados podem explicar por que menores concentrações de células em uma diluição e em recipientes mais flexíveis sobrevivem melhor ao congelamento (GIRAUD *et al.*, 2000, citado por SARAGUSTY *et al.*, 2009), ou por que o congelamento em sacolas plásticas mais flexíveis, conhecidas como *FlatPacks*



produzem melhores resultados do que o mesmo volume congelado em macrotubos (EKWALL, 2009; ERIKSSON *et al.*, 2001). Estes resultados foram inicialmente observados em outro estudo feito por Eriksson e colaboradores (2002), os quais compararam a fertilidade de espermatozóides suínos congelados em *FlatPacks* com monta natural e inseminação artificial com sêmen refrigerado. Os resultados sugeriram que este tipo de envase permite manter a viabilidade espermática pós-descongelamento e, além disso, que a porcentagem de fertilidade obtida com sêmen congelado neste tipo de envase é similar à obtida com monta natural e inseminação artificial com sêmen resfriado.

Segundo Ekwall *et al.* (2007), espermatozóides congelados em recipientes planos, denominados como *MiniFlatPacks*, mostraram maior motilidade linear pós-descongelamento do que aqueles que foram congelados em palhetas de 0,5 mL. Nesse mesmo estudo, as amostras foram avaliadas mediante o uso de criomicroscopia eletrônica de varredura, observando-se grandes cristais de gelo e canálculos onde ficaram alojados os espermatozóides, solutos e criopreservantes. Os cristais de gelo encontrados no recipiente plano (*MiniFlatPacks*) foram mais homogêneos e de maior tamanho do que na palheta, o que indica que a desidratação naquele (*MiniFlatPacks*) foi mais homogênea, e que este fato está relacionado com uma melhor qualidade pós-descongelamento. Na palheta se observou um padrão de formação de cristais de gelo com diferentes tamanhos, sendo de menor tamanho na periferia da palheta do que no centro, provavelmente, devido a uma rápida velocidade de congelamento. Os espermatozóides que se acharam no centro da palheta apresentaram cristais de gelo na parte interior e exterior do acrossoma. A maioria dos acrossomas dos espermatozóides que estavam no centro da palheta foi destruída.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

O experimento foi realizado na cidade de Campos dos Goytacazes –RJ, onde foram utilizados quatro garanhões; três da raça Quarto de Milha e um da raça American Paint Horse, com idade entre 4 e 10 anos. Desses animais foram coletados três ejaculados de cada. Cada ejaculado foi analisado e congelado em cada um dos tratamentos, congelando-se quatro repetições por tratamento. Os ejaculados utilizados no experimento apresentavam motilidade total e progressiva superiores a 80% e células com morfologia normal superior a 75%.

#### 3.2 OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO INICIAL DO SÊMEN

O sêmen foi coletado com vagina artificial modelo Botucatu a uma temperatura de 40-42°C acoplada a um copo coletor com filtro específico para equinos, utilizando-se uma égua em cio, devidamente contida. Depois da coleta, a porção gelatinosa foi retida com auxílio do filtro e descartada e o volume do ejaculado foi determinado, utilizando-se um tubo graduado em mililitros.

O ejaculado foi analisado quanto à motilidade total e progressiva em microscopia óptica com aumento de 400X, utilizando-se uma alíquota de sêmen *in natura* mantida a 37°C em banho-maria protegida da luz.

Para determinar a concentração espermática, uma amostra de 50 µL de sêmen foi diluída em 9,95 mL de solução formol citrato (2,94 g de Citrato de Sódio em 100 mL de água destilada, onde foi removido 4 mL desta solução e adicionado 4 mL de formaldeído). Uma alíquota desta diluição foi colocada na câmara de Newbauer para posterior contagem em microscópio ótico com aumento de 1000 vezes.

### 3.3 DILUIÇÃO DO SÊMEN E MÉTODO DE CONGELAMENTO

O sêmen com motilidade total e progressiva superior a 80% foi diluído em diluente de centrifugação a 37°C, proposto por Souza e colaboradores em 2001, contendo leite desnatado Molico<sup>®</sup> Nestle (10g), AGROVET<sup>®</sup> (0.4g) de Novartis e água destilada q.s.p (100 mL), na proporção de uma parte de sêmen para duas partes de diluente, e em seguida foi centrifugado durante 10 minutos a 600 g à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão e homogeneizado no diluente de congelamento, obtendo a concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

O diluente de congelamento utilizado foi proposto por Martin *et al.* (1979) modificado baseado em Vidament *et al.* (2002). Este continha 50 mL de lactose 11% (Vetec), 25 mL de glicose-EDTA (12 g de glicose; 0,240 g de carbonato de sódio (Vetec); 0,740 g de EDTA (Sigma); 0,750 g de citrato de sódio 2H<sub>2</sub>O(Sigma); 0,8 g de AGROVET<sup>®</sup>; 200 mL de água destilada q.s.q., 20 mL de gema de ovo *in natura*, 3 mL de glicerol (Vetec), 2 mL de dimetilformamida (Vetec) e 0,5 mL de Equex<sup>®</sup> – Farmacia, *Orvus et paste*.

O envase do sêmen foi feito em palhetas convencionais de 0.5 mL (IMV), macrotubos de 4 mL (Nutricell) e no novo recipiente plano experimental (FlatBag) de 0,5 mL (largura 3 cm X comprimento 4 cm) e 4 mL, (largura 3 cm x comprimento 10 cm). Os recipientes planos experimentais tinham aproximadamente 0,3 mm de espessura quando se encontravam vazios e quando estes eram enchidos com sêmen alcançavam uma espessura aproximada de 1,5 mm. Quando os recipientes planos eram enchidos com sêmen diluído, o ar presente dentre estes, era esvaziado manualmente até o máximo, para evitar que eles explodissem no descongelamento. (Figura 2).

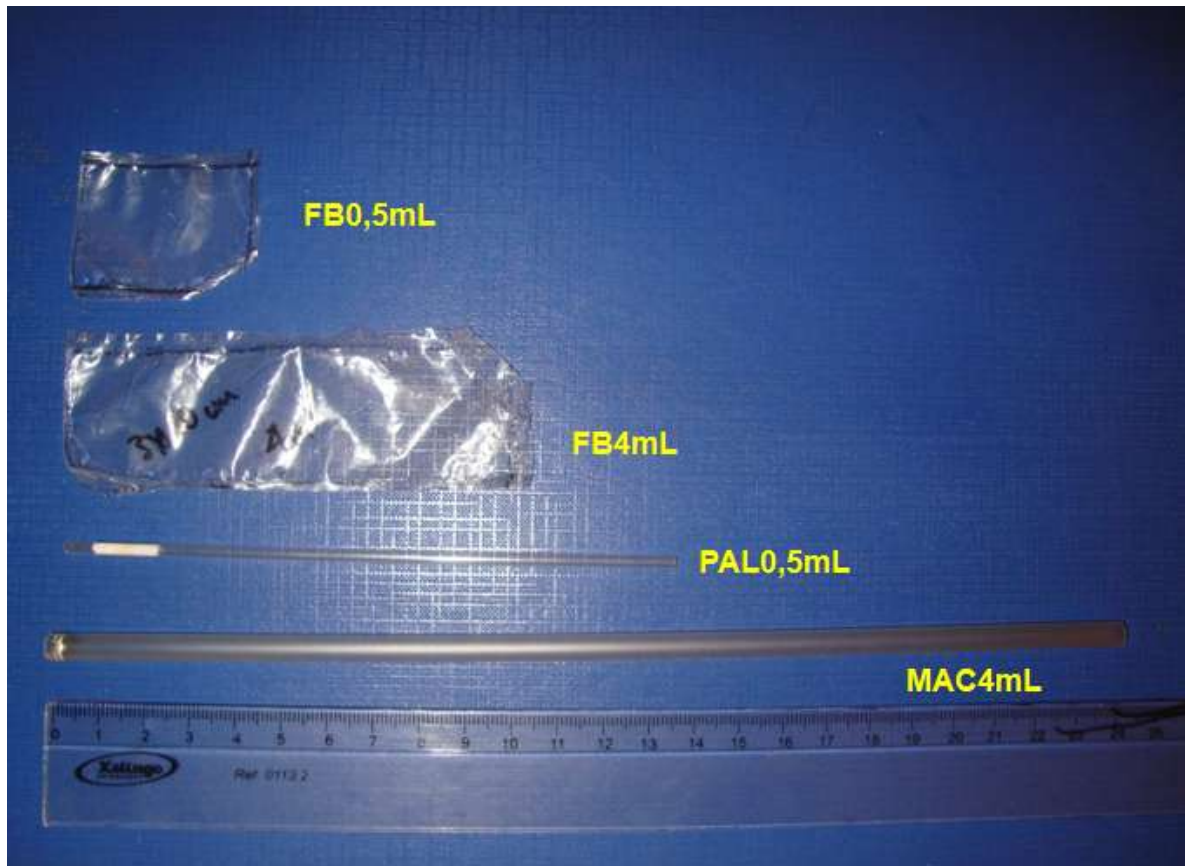


Figura 2 - Tipos de recipientes testados. Recipientes planos (FlatBag de 0,5mL “FB0,5mL” e FlatBag de 4mL “FB4mL”) e Recipientes cilíndricos (Palheta de 0,5mL “PAL0,5mL” e Macrotubo de 4mL “MAC4mL” (Arquivo pessoal, 2011).

Depois do envase do sêmen nos recipientes planos e palhetas, estes foram selados com calor. Em seguida os recipientes e as palhetas foram colocados à temperatura de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos.

Posteriormente, as amostras foram colocadas a 4 cm acima do nível do nitrogênio líquido em um período de 10 minutos e, em seguida, imersas no mesmo e, então, armazenadas no botijão.

### 3.4 DESCONGELAMENTO DO SÊMEN

As palhetas, os macrotubos e os recipientes experimentais planos foram descongelados em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos e em seguida o

conteúdo foi colocado em tubos plásticos de microcentrífuga, mantidos a 37°C e protegidos da luz .

### 3.5 ANÁLISE COMPARATIVA

As variáveis de motilidade e cinemática, funcionalidade e integridade de membrana plasmática do sêmen congelado foram comparadas em cada tratamento: palheta de 0,5 mL (tratamento 1), macrotubo de 4 mL (tratamento 2), “FlatBag” de 0,5 mL (tratamento 3) e “FlatBag” de 4 mL (tratamento 4).

#### 3.5.1 Motilidade e cinemática dos espermatozóides

A motilidade e cinemática foram avaliadas pelo sistema de análise computadorizada (CASA) Hamilton Thorn Research modelo Ceros 10.8<sup>®</sup>, usando o programa específico para análise do sêmen de equino. Uma amostra de 5µL de sêmen descongelado foi colocada em uma lâmina pré-aquecida a  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  recobrando-a com uma lamínula. Dez campos foram analisados em microscópio ótico com aumento de 100x acoplado ao computador. O sêmen foi avaliado a cada 30 minutos durante uma hora, tomando o tempo “0” como inicial, logo após o descongelamento.

Para a motilidade espermática foram analisadas as variáveis de motilidade total (MT, %) e progressiva (MP, %). Para a cinemática, foram analisados parâmetros de velocidade média do trajeto (VAP em  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) que representa a velocidade do trajeto médio realizado pelo espermatozóide em um período; a velocidade progressiva (VSL em  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) que representa a velocidade do trajeto medido em uma linha reta desde o ponto inicial até o ponto final e a velocidade curvilínea (VCL em  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) que estima a proximidade do trajeto do espermatozóide a uma linha reta.

### **3.5.2 Funcionalidade da membrana plasmática do espermatozóide**

A funcionalidade da membrana espermática foi avaliada no tempo 0 pós-descongelamento, por meio do teste do choque hiposmótico, utilizando-se a técnica desenvolvida por Dell'Aqua Júnior (2000). Em um tubo de microcentrífuga foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de sêmen em 950  $\mu\text{L}$  de água destilada a 37°C. As amostras foram incubadas por 5 minutos em banho-maria a 38°C. Em seguida foi colocada uma amostra de 10  $\mu\text{L}$  sobre a lâmina, recobrimo-a com uma lamínula e a mesma foi examinada no microscópio de contraste de fase com aumento de 400x. Foram contadas 200 células espermáticas, considerando-se as células com membrana funcional aquelas que apresentaram a cauda dobrada ou enrolada e não funcionais aquelas que permaneceram com a cauda esticada.

### **3.5.3 Avaliação da membrana plasmática**

Após o descongelamento, a avaliação da membrana plasmática foi verificada pelo uso da sonda fluorescente iodeto de propídio (PI, Sigma®). Uma amostra de 200  $\mu\text{L}$  sêmen pós-descongelamento foi adicionada em 1 mL de meio TALP sp. Chamberland. Em seguida, uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  dessa solução foi colocada em um tubo de microcentrífuga e adicionados 3  $\mu\text{L}$  de PI (0,5 mg/mL em PBS). A amostra foi incubada por 8 minutos a 37°C e, em seguida, colocada uma amostra de 10  $\mu\text{L}$  entre lâmina e lamínula para observação em microscópio de epifluorescência com aumento de 1000X utilizando-se óleo de imersão. De cada lâmina foram contadas 200 células. A marcação vermelha no núcleo indica lesão da membrana plasmática (CELEGHINI, 2005).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram comparadas as médias de cada uma das variáveis avaliadas (motilidade total, motilidade progressiva, velocidade média do trajeto, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, funcionalidade da membrana plasmática, integridade da membrana plasmática) em cada um dos tratamentos, pelo teste de Tukey em nível de significância de 5%.

O efeito dos tratamentos em função do tempo, nas variáveis de motilidade e cinemática avaliadas, foi analisado por regressão.

As análises estatísticas foram procedidas no aplicativo Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1).

## 4. RESULTADOS

Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para todos os parâmetros de motilidade, cinemática, funcionalidade e integridade de membrana, quando procedeu-se a comparação entre os recipientes testados de um mesmo tempo e/ou entre o mesmo recipiente em cada um dos três tempos avaliados.

Foi observada uma diminuição de todas as variáveis de motilidade (MT e MP) e cinemática (VCL, VSL, VAP) ao decorrer dos três tempos (0, 30 e 60).

### 4.1 MOTILIDADE

#### 4.1.1 Motilidade Total (MT, %)

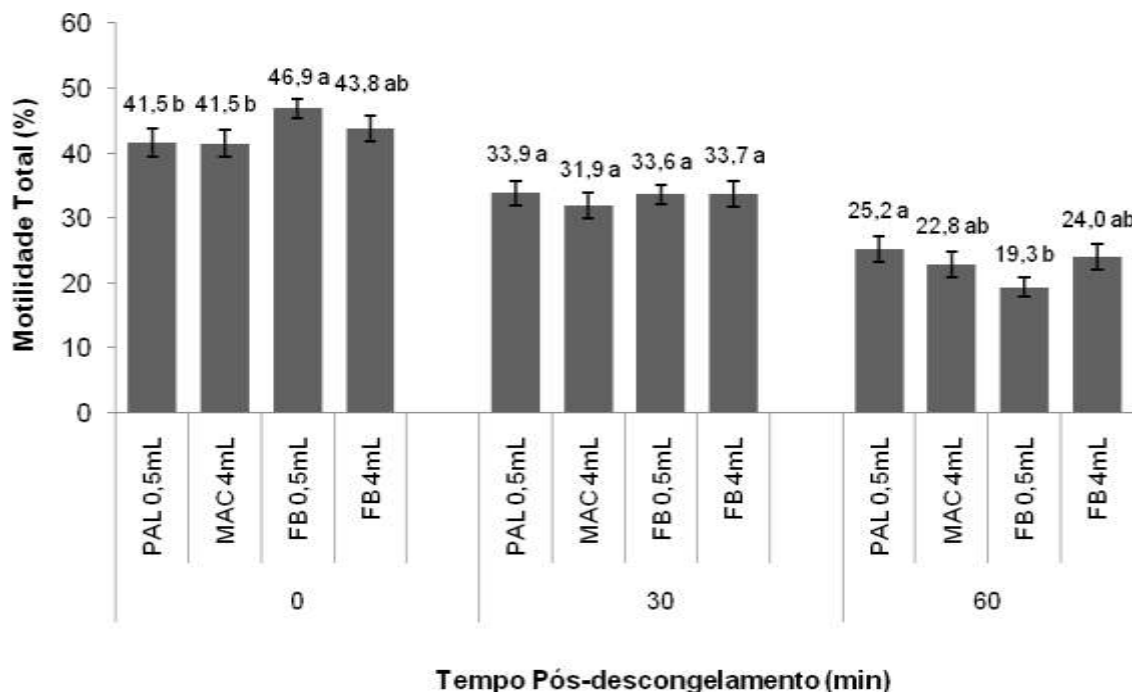


Figura 3 – Motilidade Total (%) em função do tempo de pós-descongelamento em minutos (min), para os recipientes: palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL (FB4mL). (\*) Médias seguidas por uma mesma letra, em cada tempo, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.



No tempo 0, foi possível observar diferença significativa entre os recipientes ( $p < 0,05$ ), sendo maior o número de espermatozoides com motilidade total, para o FB0,5mL, quando comparado com a PAL0,5mL e MAC4mL. Não houve diferença significativa entre FB4mL, PAL0,5mL e MAC4mL (Figura 3).

No tempo 30 não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Para o tempo 60, o FB0,5mL apresentou a motilidade total mais baixa, quando comparada com a PAL0,5mL e não houve diferença significativa entre a PAL0,5mL, MAC4mL e FB4mL (Figura 3).

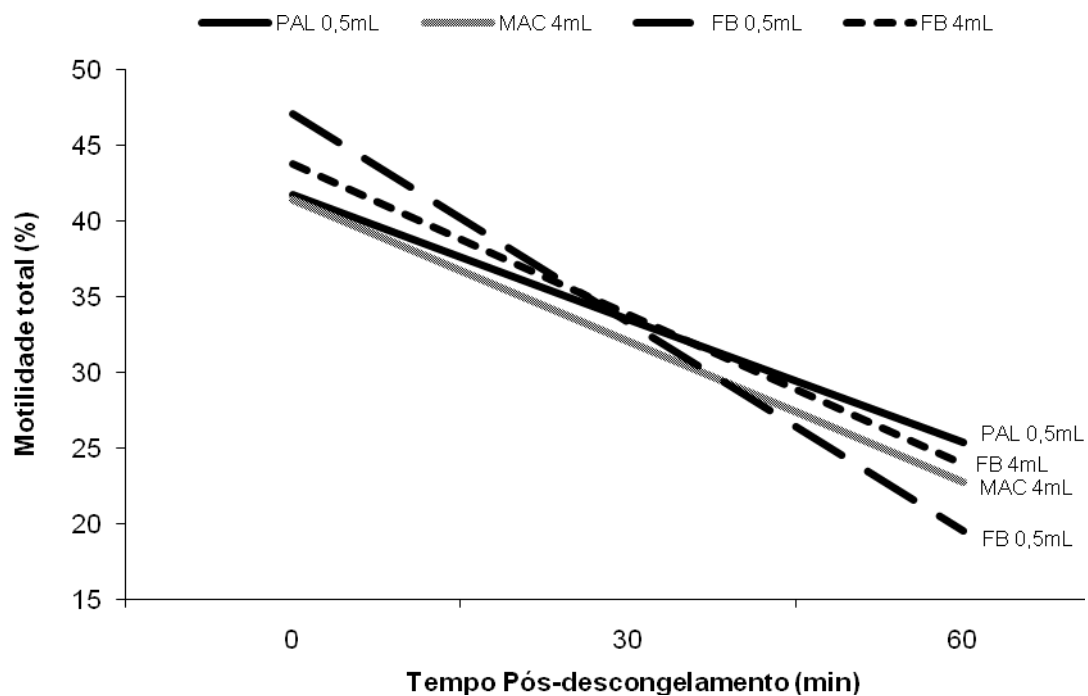


Figura 4 – Análise de regressão da motilidade total (%) nos 4 recipientes em função do tempo de pós-descongelamento em minutos (min) para os recipientes: Palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL (FB4mL).

Na figura 4, se observa uma queda mais rápida da linha que representa o FB0,5mL, com um coeficiente linear (-0,4590) da equação de regressão (VER ANEXO A), menor do que os outros recipientes. No tempo 0, os recipientes cilíndricos (PAL0,5mL e MAC4mL) tiveram um comportamento muito similar, mas no tempo 60, pode-se observar que, a linha que representa o MAC4mL teve uma queda muito mais rápida do que a que representa a PAL0,5mL. No decorrer do tempo, a

PAL0,5mL teve uma queda mais lenta da MT, quando comparado com os outros recipientes.

#### 4.1.2 Motilidade progressiva (MP, %)

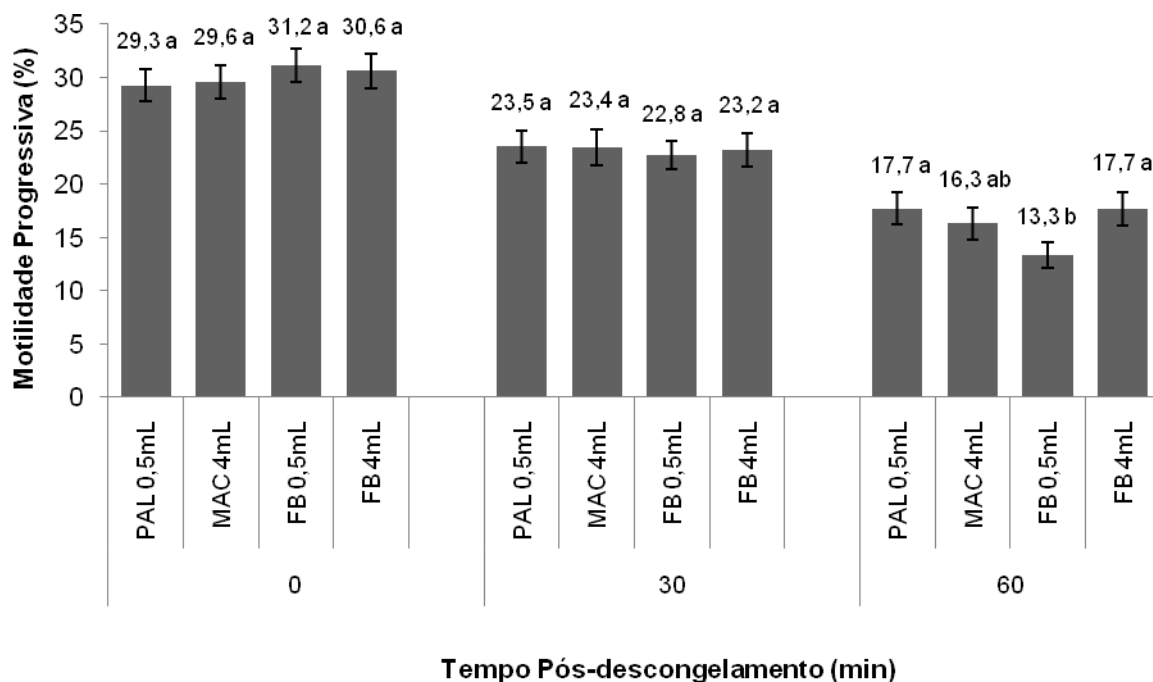


Figura 5 – Motilidade Progressiva (%) em função do tempo de pós-descongelamento, para os recipientes: palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL (FB4mL). (\*) Médias seguidas por uma mesma letra, em cada tempo, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Não houve diferença estatística da motilidade progressiva entre os recipientes testados no tempo 0 e 30 ( $p > 0,05$ ) (Figura 5).

No tempo 60, a PAL0,5mL e o FB4mL apresentaram melhor motilidade progressiva ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o FB0,5mL. Não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os recipientes cilíndricos. Houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os recipientes planos (Figura 5).

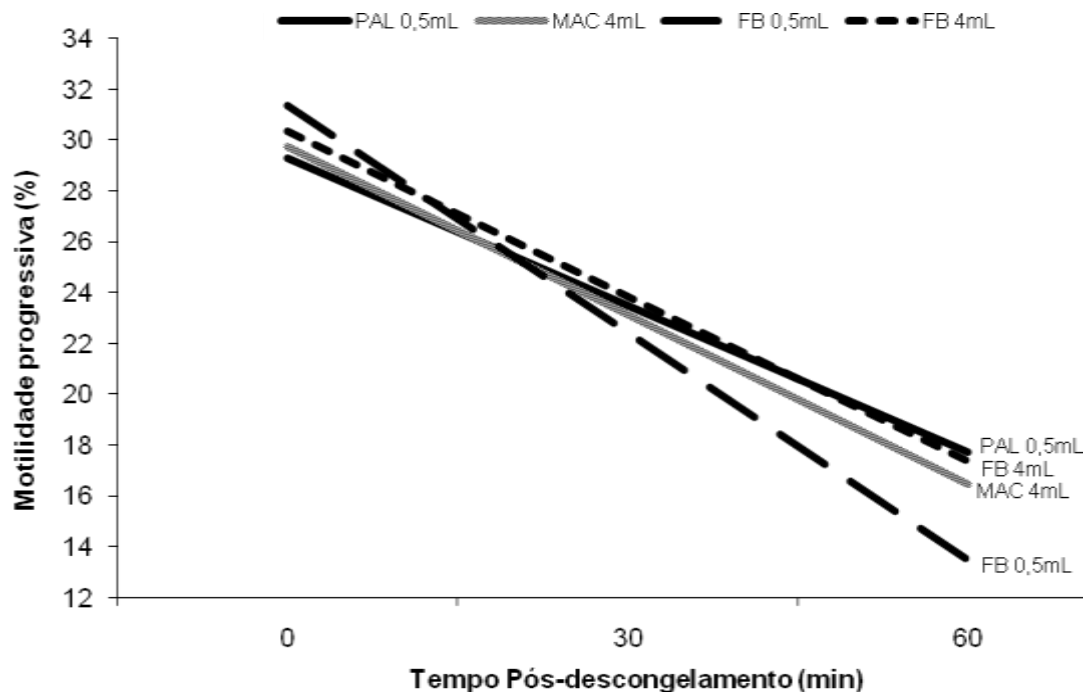


Figura 6 – Análises de regressão da motilidade progressiva (%) nos 4 recipientes em função do tempo de pós-descongelamento em minutos (min). para os recipientes: palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL (FB4mL).

O coeficiente linear (-0.2982) do FB0,5mL, foi menor quando comparado com os outros recipientes (VER ANEXO B), isto demonstra que, a motilidade progressiva teve uma queda mais rápida quando, os espermatozoides eram congelados em recipientes planos de pequenos volumes. A PAL0,5mL, FB4mL e MAC4mL tenderam a preservar melhor a motilidade progressiva quando comparado com o FB0,5mL (Figura 6) .

## 4.2 CINEMÁTICA

### 4.2.1 Velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m}/\text{sec}$ )

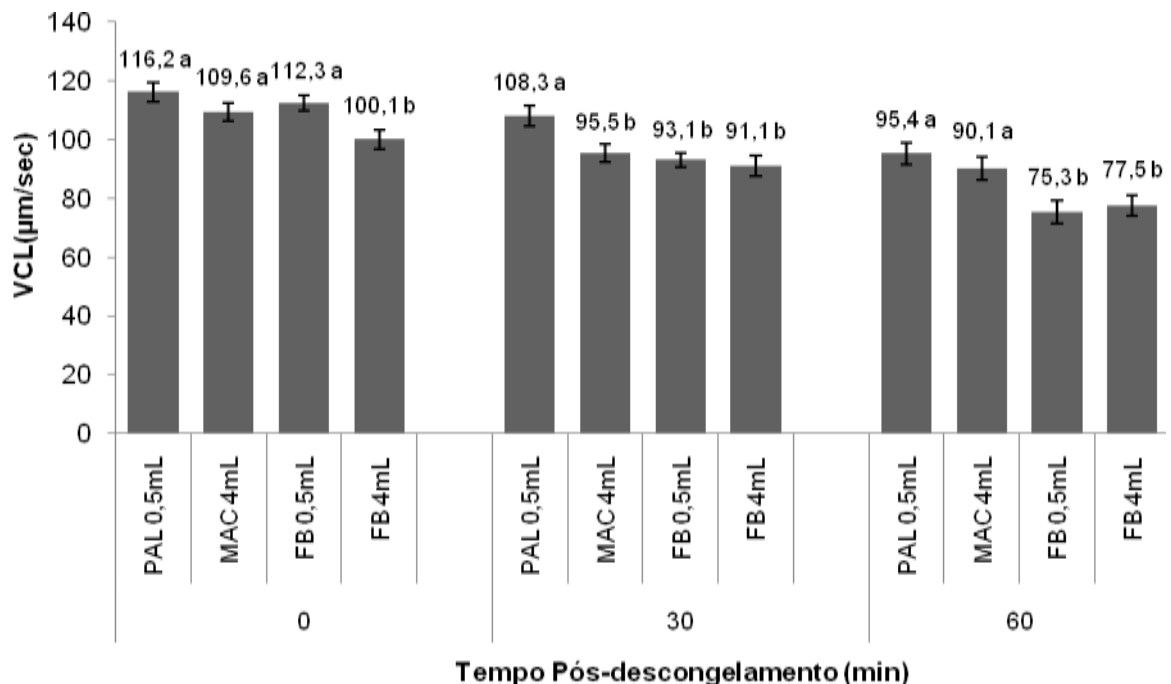


Figura 7 – Velocidade Curvilínea (VCL,  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) em função do tempo de pós-descongelamento. Para os recipientes: palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL (FB4mL). (\*) Médias seguidas por uma mesma letra, em cada tempo, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Na figura 7, os resultados obtidos de VCL demonstram que, a PAL0,5mL manteve bons resultados nos três tempos avaliados.

No tempo 0, só o FB4,0mL mostrou o menor valor de VCL e os outros recipientes não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ). No tempo 30, houve diferença significativa entre PAL0,5mL e os outros recipientes ( $p < 0,05$ ). No tempo 60, observa-se diferença estatística entre os recipientes cilíndricos e os planos ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).

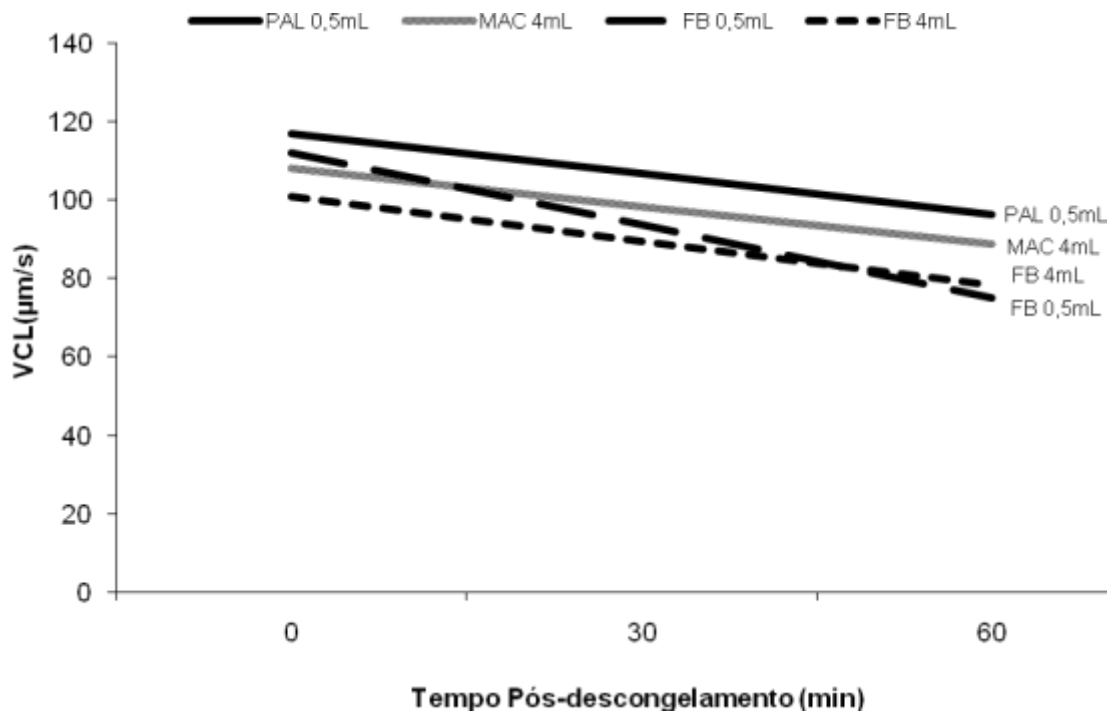


Figura 8 – Análise de regressão da velocidade curvilínea (VCL,  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) nos 4 recipientes em função do tempo de pós-descongelamento em minutos (min). Para os recipientes: palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL (FB4mL).

Na análise de regressão, o coeficiente linear (-0,6180), da equação de regressão (VER ANEXO C) que explica a linha do FB0,5mL, mostra uma queda mais rápida do VCL. Esta queda mais rápida apresentada no FB0,5mL, também aconteceu na MT e MP. No tempo 0, pode-se observar que, os recipientes de 0,5mL tendem a mostrar pontos de partida mais próximos, mas no decorrer do tempo, estes recipientes, mostram diferenças nos seus resultados. Ao parecer, no tempo 60, os resultados foram mais dependentes da forma dos recipientes do que do volume (Figura 8).

#### 4.2.2 Velocidade média do trajeto (VAP, $\mu\text{m}/\text{sec}$ )

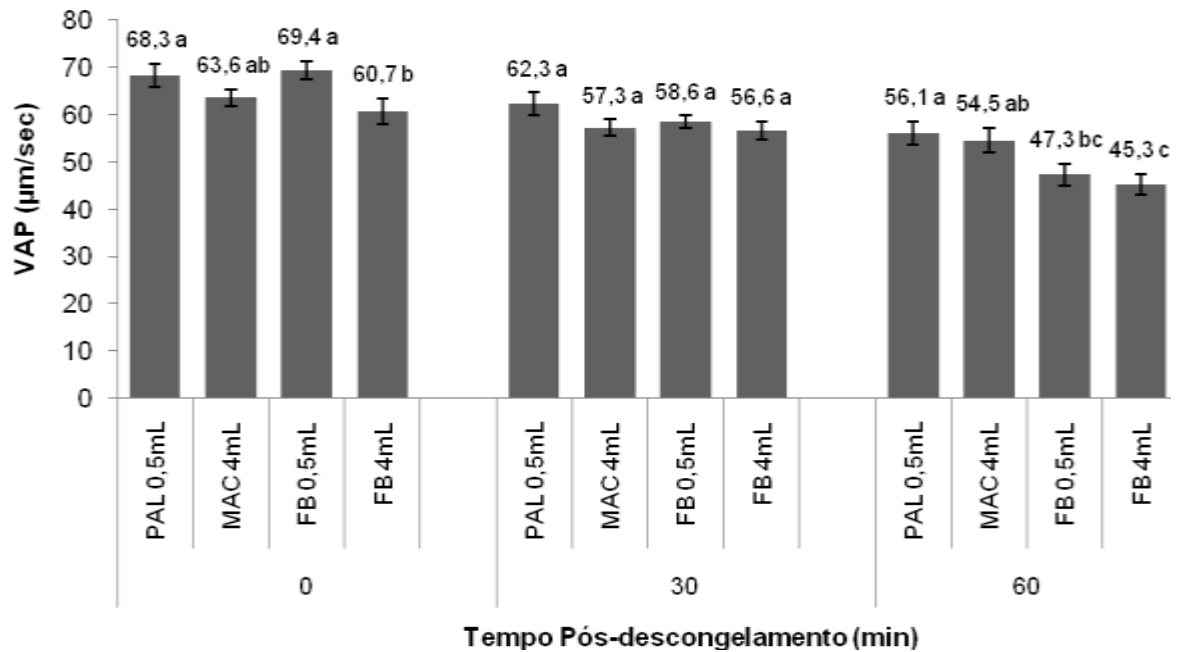


Figura 9 – Velocidade média do trajeto (VAP,  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) em função do tempo de pós-descongelamento, para os recipientes: Palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL (FB4mL). (\*) Médias seguidas por uma mesma letra, em cada tempo, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

No tempo 0, os espermatozoides armazenados em volumes de 0,5mL, apresentaram maior VAP, quando comparados com os armazenados nos FB4mL. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o MAC4mL e os outros recipientes (Figura 9).

No tempo 30, não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os recipientes (Figura 9).

No tempo 60, os FB0,5mL e FB4mL mostraram menor velocidade quando comparados com a PAL0,5mL. Os resultados obtidos neste tempo foram dependentes da forma do recipiente, sendo melhores para aquelas amostras congeladas nos recipientes convencionais (palhetas e macrotubos) (Figura 9).

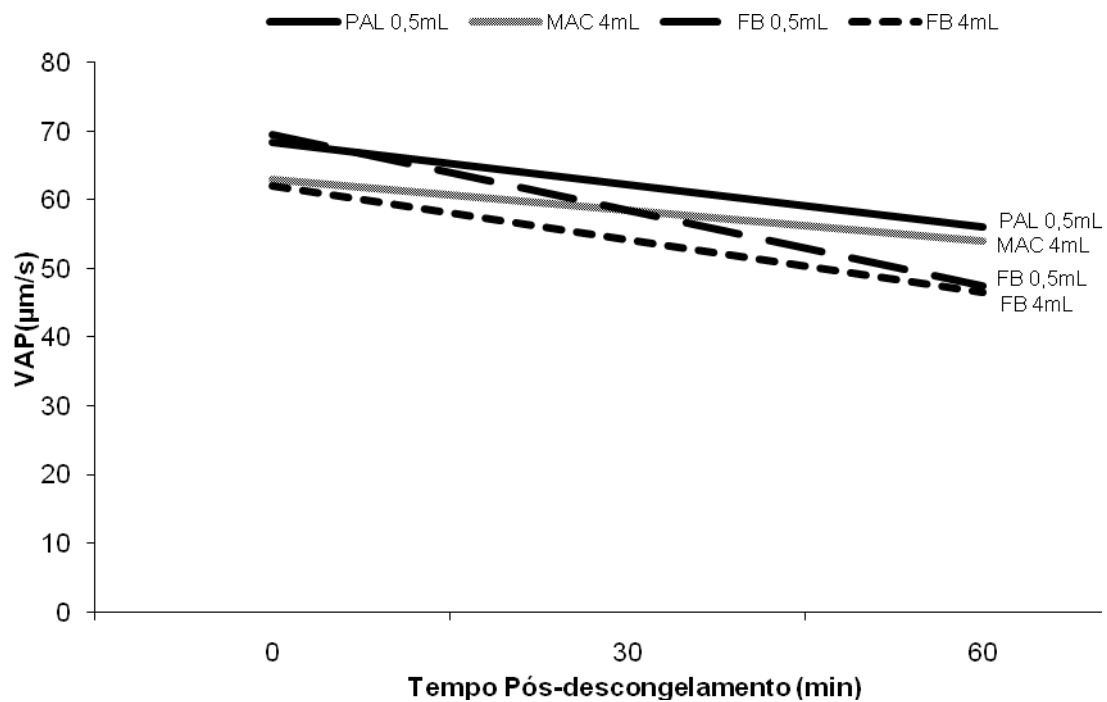


Figura 10 – Análise de regressão da velocidade média do trajeto (VAP,  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) nos 4 recipientes em função do tempo de pós-descongelamento em minutos (min). para os recipientes: palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL (FB4mL).

Na figura 10, Note-se que os recipientes de tipo cilíndrico (PAL0,5mL e MAC4,0mL) têm uma queda mais lenta quando comparados com aqueles de tipo plano (FB0,5mL e FB4mL). O FB0,5mL apresenta o menor coeficiente linear (-0,3670), deste modo, a queda do VAP foi mais rápida. Note-se também que, no tempo 0, os pontos de partida que coincidem entre si, são correspondentes às linhas do mesmo volume, e que, no tempo 60, às linhas que coincidem entre si, correspondem a uma mesma forma de recipiente, porém, volumes distintos, demonstrando que ao decorrer do tempo, a forma do recipiente pode estar relacionada com melhor preservação do VAP (VER ANEXO D).

### 4.2.3 Velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m}/\text{sec}$ )

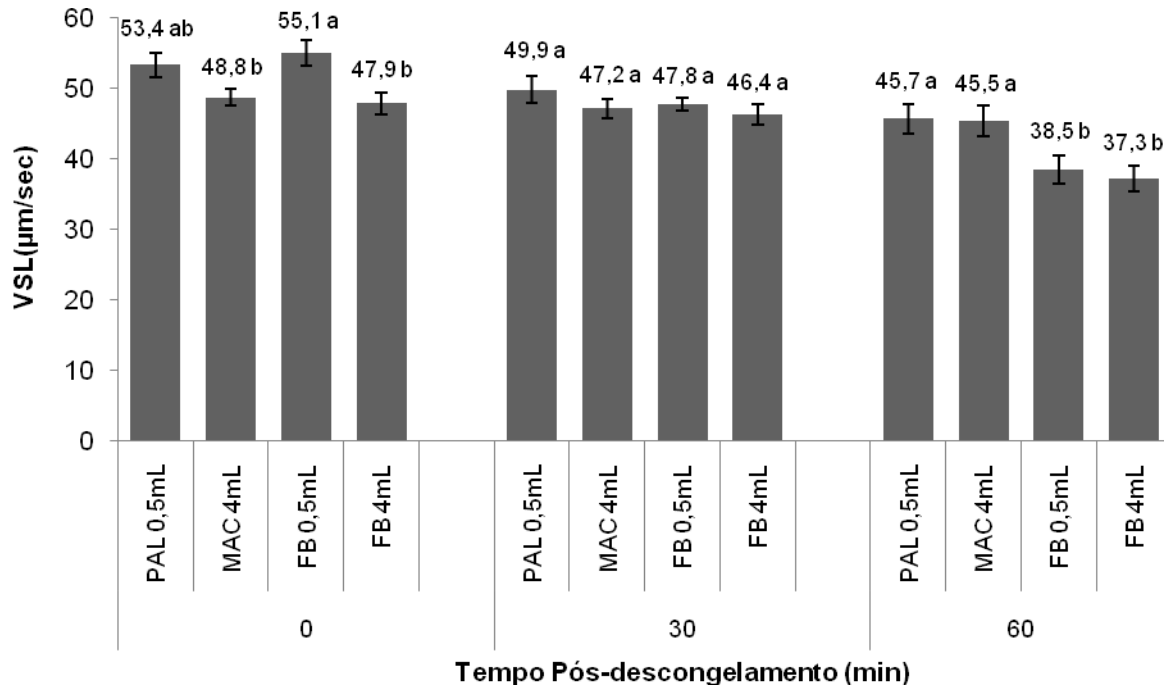


Figura 11 – Velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m}/\text{sec}$ ) em função do tempo de pós-descongelamento, para os recipientes: Palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL (FB4mL). (\*) Médias seguidas por uma mesma letra, em cada tempo, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

No tempo 0, houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado os recipientes de 4mL com a FB0,5mL. Não houve diferença significativa entre a PAL0,5mL, MAC4mL e FB4mL (Figura 11).

No tempo 30, não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) (Figura 11).

No tempo 60, Houve diferença significativa entre os recipientes cilíndricos e planos, sendo maior o VSL, para aqueles espermatozóides congelados em recipientes cilíndricos (PAL0,5mL e MAC4mL). Os resultados obtidos nesta pesquisa, mostraram baixos resultados de VCL, VAP e VSL no tempo 60, mas, no tempo 0, o FB0,5mL teve resultados semelhantes a PAL0,5mL (Figura 11).



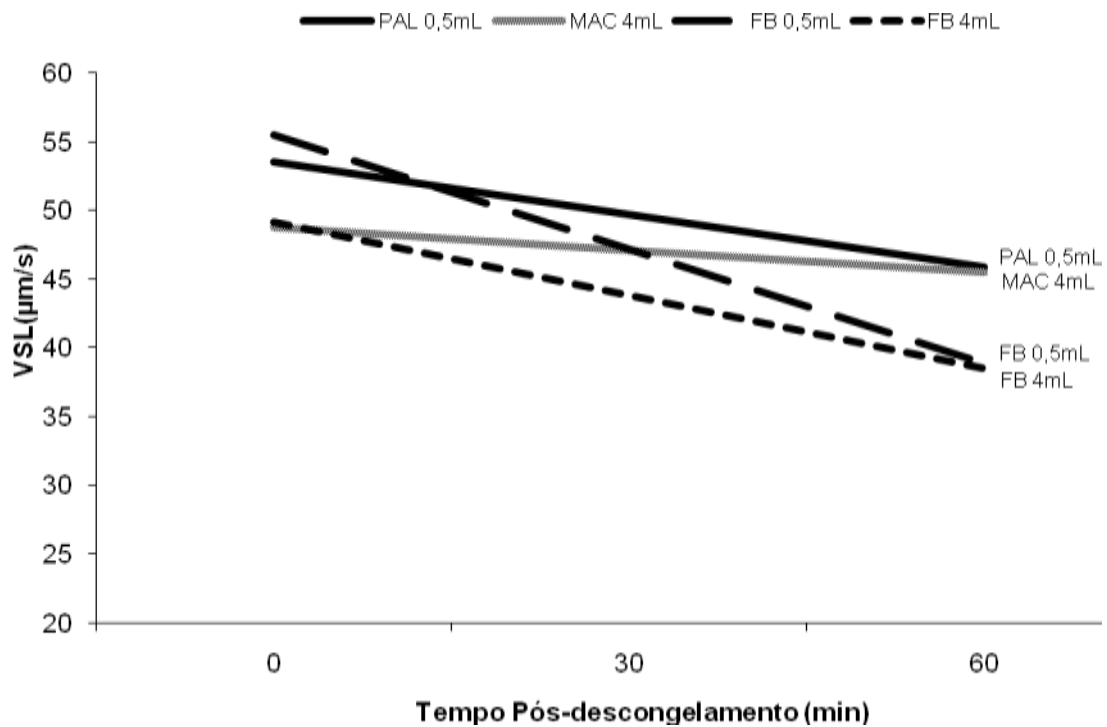


Figura 12 – Análise de regressão da velocidade progressiva (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ) nos 4 recipientes em função do tempo de pós-descongelamento em minutos (min), para os recipientes: palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL (FB4mL).

Os FB0,5mL e FB4mL apresentaram o menor coeficiente linear (-0,2770 e -0,1780, respectivamente) (VER ANEXO E), portanto a taxa de queda foi mais rápida do que os outros recipientes. No tempo 0, as linhas que representam os recipientes de mesmo volume, têm um ponto de início semelhante. No tempo 60, os resultados foram semelhantes, para a mesma forma do recipiente. Pode-se observar também que quanto maior tempo percorrido, menor será o VSL (Figura 12).

As médias de VCL em um mesmo tempo, em cada um dos tratamentos, foram maiores do que as suas respectivas médias do VAP e estas por sua vez foram maiores do que as médias do VSL ( $VCL > VAP > VSL$ ).

### 4.3 INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DE MEMBRANA

#### 4.3.1 Funcionalidade de Membrana

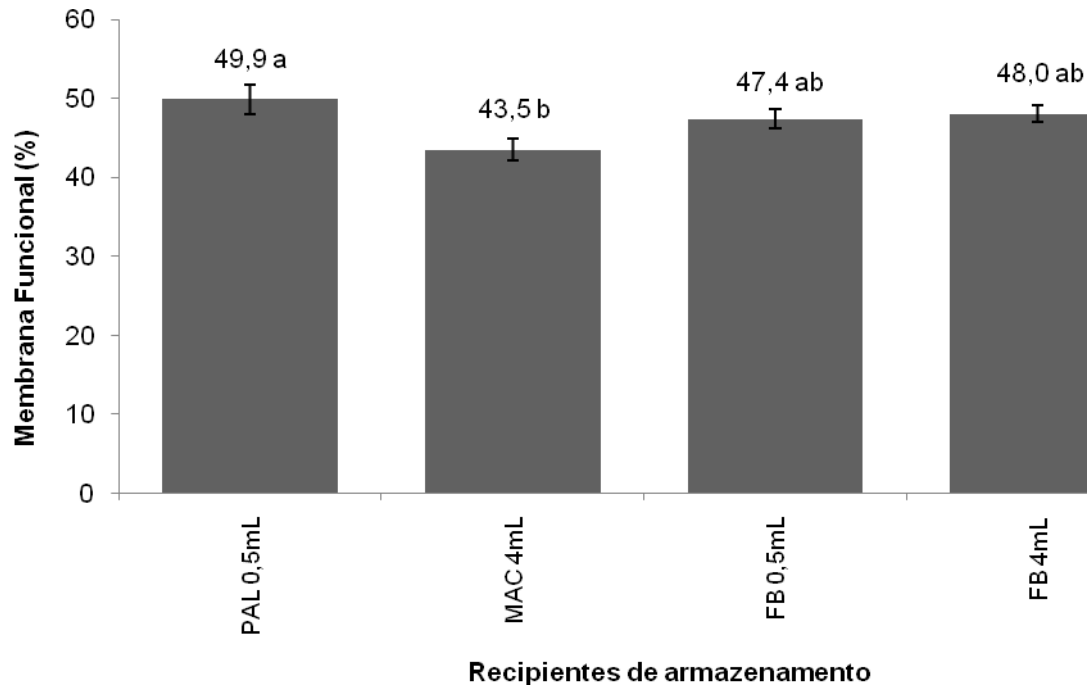


Figura 13 – Funcionalidade de membrana (%) nos recipientes de armazenamento no tempo 0 pós-descongelamento em minutos (min), para os recipientes: palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL (FB4mL). (\*) Médias seguidas por uma mesma letra, em cada tempo, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

O teste hiposmótico foi avaliado em todos os recipientes no tempo 0 pós-descongelamento. A funcionalidade de membrana foi menor no MAC4mL quando comparada com a PAL0,5mL. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre a PAL0,5mL e os recipientes planos (Figura 13).

### 4.3.2 Integridade de membrana

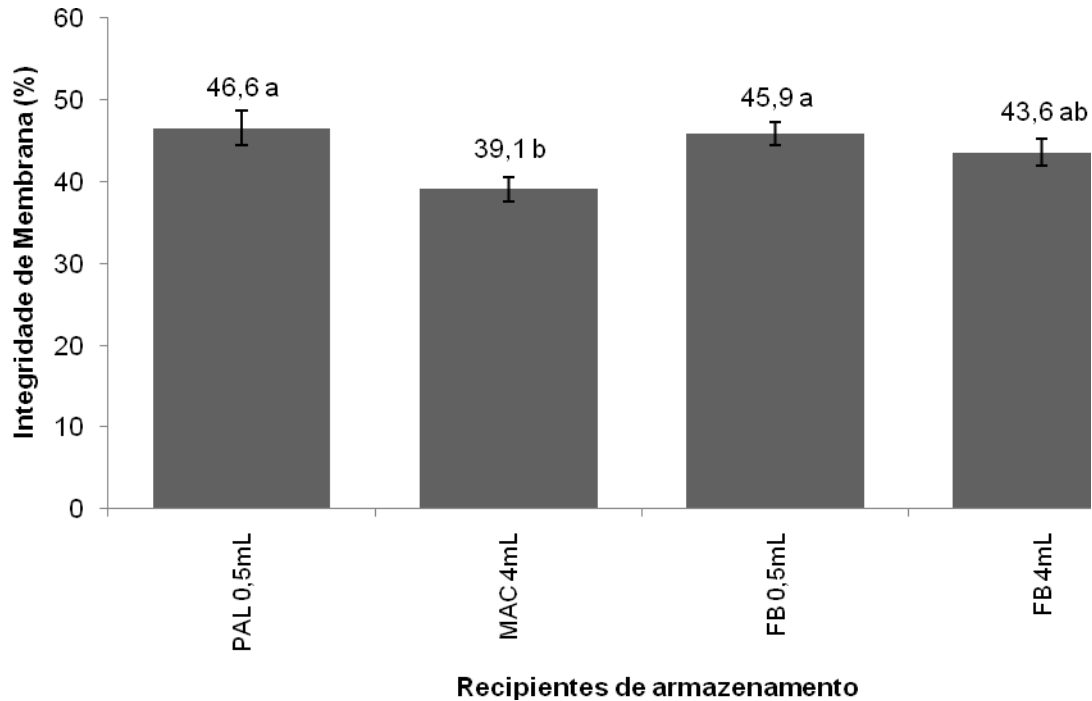


Figura 14 – Integridade de Membrana (%) nos recipientes de armazenamento no tempo 0 pós-descongelamento em minutos (min), para os recipientes: palheta de 0,5mL (PAL0,5mL), macrotubo de 4mL (MAC4mL), “FlatBag” de 0,5mL (FB0,5mL) e “FlatBag” de 4mL. (\*) Médias seguidas por uma mesma letra, em cada tempo, não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey.

Enquanto à integridade de membrana, esta foi avaliada com iodeto de propídio. As amostras congeladas em pequenos volumes mantiveram melhor a integridade de membrana quando comparada com as amostras congeladas em recipientes cilíndricos de grandes volumes (MAC4mL) (Figura 14).

Os espermatozoides armazenados e congelados em MAC4mL apresentaram a pior integridade (Figura 13) e funcionalidade de membrana quando comparados com a PAL0,5mL (Figura 14).

A PAL0,5mL foi superior a todos os recipientes na maioria dos parâmetros avaliados.

No decorrer dos tempos avaliados, a PAL0,5mL mostrou-se a melhor na maioria dos parâmetros aqui testados, quando comparada com os outros recipientes.

Na análise de regressão das variáveis de motilidade e cinemática, o FB0,5mL teve o menor coeficiente linear, demonstrando uma taxa de queda mais rápida do que os outros recipientes.

As amostras envasadas e congeladas nos recipientes cilíndricos (PAL0,5mL e MAC4mL) foram superiores no decorrer do tempo, quanto à cinemática, quando comparadas com aquelas envasadas nos recipientes planos.

Dos recipientes planos avaliados nesta pesquisa, O FB4mL teve melhores resultados no tempo 60.

Nas figuras 13 e 14, quanto à funcionalidade e integridade de membrana, não houve diferença estatística entre os recipientes planos e PAL0,5mL. O MAC4mL apresentou a pior funcionalidade e integridade de membrana quando comparado com a PAL0,5mL.

## 5. DISCUSSÃO

A curva de congelamento e descongelamento utilizada para cada um dos recipientes foi a mesma, podendo existir um efeito sobre os resultados, dependente da temperatura.

### 5.1 MOTILIDADE

#### 5.1.1 Motilidade total (MT)

Foram observados melhores resultados de motilidade total no tempo 0, em amostras congeladas em recipientes planos quando comparados com macrotubos. Estes mesmos resultados foram observados por Eriksson e Rodriguez-Martinez (2000a), atribuindo este fato a uma maior velocidade de descongelamento, favorecida pela forma plana do recipiente que apresenta uma melhor transferência de calor, permitindo um rápido e uniforme descongelamento.

Nenhuma das pesquisas realizadas com congelamento de sêmen em recipientes planos mostra resultados em um período de avaliação prolongado.

No tempo 0, foi possível observar diferença significativa entre os recipientes ( $p < 0,05$ ), sendo maior o número de espermatozóides com motilidade total, para o FB0,5mL, quando comparado com os recipientes cilíndricos, provavelmente devido à forma do “FlatBag” que favorece a troca de calor (Figura 3).

Nesta pesquisa, os resultados de motilidade total no tempo 60 demonstraram que, embora inicialmente, o FB0,5mL tenha apresentado a melhor porcentagem quando comparado com os recipientes cilíndricos, ao decorrer do tempo, a MT diminui, portanto, pode-se dizer que pequenos volumes congelados em recipientes planos tendem a diminuir sua MT com maior rapidez, talvez, porque, a temperatura de descongelamento não seja adequada para este volume e tipo de recipiente.

Na figura 4, se observa uma queda mais rápida da linha que representa o FB0,5mL, com um coeficiente linear (-0,4590) da equação de regressão, menor do

que os outros recipientes; fato que também aconteceu com a MP (Figura 6), onde o coeficiente linear (-0.2982) do FB0,5mL, foi menor quando comparado com os outros recipientes, confirmando assim, que pequenos volumes congelados em recipientes planos tendem a diminuir com maior rapidez a MT quando comparado com outros recipientes e volumes.

### 5.1.2 Motilidade progressiva (MP)

Os resultados de MT (Figura 3) e MP (Figura 5) pós-descongelamento em cada um dos tratamentos no tempo 0, são compatíveis com os reportados para sêmen equino criopreservado (VIDAMENT, 2002; JULIANI e HENRY, 2008).

Não houve diferença estatística da motilidade progressiva entre os recipientes testados no tempo 0 e 30 ( $p > 0,05$ ). O FB0,5mL apresentou a menor quantidade de células com motilidade progressiva no tempo 60 quando comparado com PAL0,5mL e FB4mL (Figura 5).

Segundo Eriksson e Rodriguez-Martinez (2000a), o procedimento de congelamento-descongelamento, pode ser menos lesivo para algumas membranas do que para outras, pois, o compartimento da cabeça (relacionado à integridade de membrana plasmática e de acrossoma) e da peça intermédia e da cauda (relacionado com a motilidade) tem diferentes condições de congelamento e descongelamento. Segundo Parks e Graham (1992), citados por Nascimento *et al.* (2008), a diferença da resistência ao congelamento entre os diferentes compartimentos é atribuída às diferentes distribuições de lipídeos e proteínas entre as regiões peri-acrossomal e pós-acrossomal. Outros estudos indicaram que a proporção de colesterol:fosfolipídios da membrana plasmática determina a fluidez da membrana e sua estabilidade durante a criopreservação (DARIN-BENNETT, *et al.* 1977; MOORE *et al.*, 2005, citados por NASCIMENTO *et al.* 2008). Segundo Holt (2000), os efeitos deletérios da refrigeração sobre a célula podem se apresentar de forma diferente entre as espécies animais, entre indivíduos e ainda entre compartimentos de um espermatozóide, como o acrossômico ou o mitocondrial. Cabe ressaltar que para uma mesma temperatura de descongelamento (37°C/30 segundos) o volume e a forma do envase proporcionam curvas de descongelamento

diferentes e, conseqüentemente, esta vai influenciar de maneira diferenciada os diversos compartimentos do espermatozóide, de forma que as lesões decorrentes do descongelamento não sejam iguais entre os distintos grupos experimentais, o que se observa nos parâmetros analisados no decorrer do tempo.

## 5.2 CINEMÁTICA

Comparando as médias dos resultados de VCL, VAP e VSL, no tempo 0, os resultados deste trabalho foram superiores aos obtidos por Fagundes (2010) e Ortega-Ferrulosa *et al.* (2009), quando comparados com os resultados do tratamento controle pós-descongelamento, isto porque para este experimento foram utilizados garanhões da raça Mangalarga Marchador e Andaluz, respectivamente, que são sabidamente raças que não congelam de forma satisfatória, quando comparadas com Quarto de Milha e Paint Horse.

### 5.2.1 Velocidade curvilínea (VCL)

Na figura 7, os bons resultados de VCL apresentados por PAL0,5mL nos tempos avaliados demonstram que, muito provavelmente, estes são decorrentes do procedimento de congelamento e descongelamento adotado neste experimento de forma geral para todos os envases/volumes que foram específicos para a palheta de volume 0,5 mL e não para os outros recipientes, pois, existem vários estudos que recomendam descongelar macrotubos de 4 ou 5mL a 50°C/45segundos (SAMPER, 2000), os recipientes planos denominados *FlatPack* de 5mL a 50°C/13 segundos ou 70°C/8segundos (ERIKSSON e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000a); estes últimos mais parecidos com os FB4mL. No tempo 0, só o FB4,0mL mostrou o menor valor de VCL e os outros recipientes não apresentaram diferença estatística ( $p>0,05$ ) (Figura 7). Estes resultados são contraditórios com os descritos por Eriksson e Rodriguez-Martinez (2000a), eles encontraram valores de VCL maiores em amostras de sêmen suíno criopreservado em recipientes planos de 5mL denominados

*FlatPack* quando comparados com macrotubos do mesmo volume, utilizando diferentes temperaturas e tempos de descongelamento. No tempo 60, observa-se diferença estatística entre os recipientes cilíndricos e os planos ( $p < 0,05$ ), em função, provavelmente, das curvas de congelamento/descongelamento se amoldarem melhor para estes envases cilíndricos com relação ao parâmetro ora analisado.

Nesta pesquisa também foi utilizado um recipiente plano, mas as dimensões do FB4mL foram menores do que as do *FlatPack*, sendo provável uma variação na espessura, que tenha afetado os resultados. Com relação à temperatura e ao tempo utilizado nesta pesquisa ( $37^{\circ}\text{C}/30\text{segundos}$ ), foi diferente das utilizadas por Eriksson e Rodriguez-Martinez; eles descongelaram as amostras a diferentes tempos e temperaturas (23seg a  $35^{\circ}\text{C}$ , 13seg a  $50^{\circ}\text{C}$  e 8seg a  $70^{\circ}\text{C}$ ), obtendo melhores resultados de motilidade espermática quando descongelados a  $50^{\circ}\text{C}$ . Esta diferença de temperaturas utilizadas levaram, com certeza, a possível causa da diferença dos resultados para cada um dos recipientes aqui testados.

Estudos em camundongos têm demonstrado que um alto valor de VCL é essencial para atravessar a união utero-tubal e então para a formação de um reservatório, assim como também, para a penetração da zona pelúcida (OLDS-CLARKE, 1996; citado por ORTEGA-FERRULOSA, 2009).

Na análise de regressão pode-se notar que o coeficiente linear (-0,6180), da equação que explica a linha do FB0,5mL, mostra uma queda mais rápida do VCL (Figura 8). Semelhante a MT e MP, esta variável também mostrou uma queda rápida após o tempo 0, quando comparado com os outros recipientes causado, possivelmente, pela curva de congelamento e descongelamento utilizadas, as quais não foram apropriadas para este tipo de envase.

### **5.2.2 Velocidade média do trajeto (VAP)**

No tempo 0, os espermatozóides armazenados em volumes de 0,5mL, apresentaram maior VAP, mostrando diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre eles e o FB4mL (Figura 9). Este fato, corroborando com o resultado do parâmetro anteriormente analisado, muito provavelmente, decorre do procedimento de



congelamento e descongelamento, adotado neste experimento de forma geral para todos os envases/volumes ser específicos para o envase palheta de volume 0,5 mL.

No tempo 60, os FB0,5mL e FB4mL mostraram menor velocidade quando comparados com a PAL0,5mL. Também neste mesmo tempo, bons resultados de VAP foram obtidos quando as amostras foram congeladas nos recipientes convencionais (palhetas e macrotubos) (Figura 9), o que também vem a corroborar o resultado do parâmetro anteriormente analisado, que se explica em função das curvas de congelamento/descongelamento se amoldarem melhor para estes envases cilíndricos com relação, também, ao parâmetro ora analisado.

O FB0,5mL apresenta o menor coeficiente linear (-0,3670), deste modo, a queda do VAP foi mais rápida (Figura 10). Estes resultados são explicados pela equação de regressão que mostra o comportamento dos tratamentos nos três tempos avaliados, causado, possivelmente, pela curva de congelamento e descongelamento utilizada que não foi apropriada para os recipientes planos e sim para os recipientes cilíndricos.

### 5.2.3 Velocidade progressiva (VSL)

No tempo 0, houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado o FB 4mL e MAC4mL com a FB0,5mL (Figura 11). Este fato, muito provavelmente, decorre do procedimento de congelamento e descongelamento adotado neste experimento de forma geral para todos os envases/volumes ser específicos para o envase palheta de volume 0,5mL, que de certa forma favoreceu o FB0,5mL para que ele apresentasse VSL semelhante ao da PAL0,5mL.

Eriksson *et al.* (2001) obtiveram maiores valores de VCL, VAP e VSL quando congelaram espermatozoides suínos em *FlatPack* de volumes de 5 mL. Eles também congelaram sêmen em palhetas de 0,5 mL e em macrotubos de 5 mL e observaram que o *FlatPack* foi sempre superior nos parâmetros de motilidade, cinemática e integridade de membrana avaliados no tempo 0. Neste estudo foi feito também um ensaio de habilidade de penetração oocitária *in vitro* aos espermatozoides congelados nos diferentes recipientes e encontraram que os espermatozoides congelados em *FlatPacks* apresentaram uma maior taxa de

penetração e houve mais espermatozoides por oócitos penetrados ( $p < 0,05$ ) quando comparado com a palheta e macrotubos.

No tempo 30, não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Os resultados obtidos nesta pesquisa mostraram baixos valores de VCL, VAP e VSL no tempo 60, mas, no tempo 0, o FB0,5mL teve um comportamento quase igual ao da palheta. É provável que a temperatura de descongelamento não tenha sido adequada para os recipientes de maior volume, tanto planos como cilíndricos, porém no decorrer do tempo, verifica-se que os recipientes cilíndricos mantêm VSL melhor que os recipientes planos.

Os FB0,5mL e FB4mL apresentaram o menor coeficiente linear (-0,2770 e -0,1780, respectivamente), portanto a taxa de queda foi mais rápida do que os outros recipientes. Pode-se observar também que quanto maior tempo percorrido, menor será o VSL (Figura 12).

As médias de VCL em um mesmo tempo, em cada um dos tratamentos, foram maiores do que as suas respectivas médias do VAP e estas por sua vez foram maiores do que as médias do VSL ( $VCL > VAP > VSL$ ). Estes resultados concordam com a literatura que reporta que entre os parâmetros de cinemática avaliados, o VCL é sempre o mais alto dos três, enquanto, o VSL é o mais baixo ( $VCL > VAP > VSL$ ). Quando as trajetórias do movimento espermático são regulares e lineares, o VAP é quase igual ao VSL, mas quando a trajetória espermática não é linear e mostra um alto grau de movimento lateral de cabeça, então o VAP será mais alto do que VSL (MORTIMER, 2000; citado por KATHIRAVAN *et al.*, 2010). As correlações positivas entre MP e os parâmetros de velocidade indicam que o espermatozóide com um trajeto linear progressivo e reto vai percorrer uma distância maior em um curto espaço de tempo (KATHIRAVAN *et al.*, 2008; citado por FAGUNDES, 2010).

### 5.3 INTEGRIDADE E FUNCIONALIDADE DE MEMBRANA

O teste hiposmótico e o teste para integridade de membrana foram avaliados em todos os recipientes, no tempo 0 pós-descongelamento. A funcionalidade de membrana foi menor no MAC4mL quando comparada com a PAL0,5mL. Não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre a PAL0,5mL e os recipientes planos, (Figura

13), o que, muito provavelmente, confirma, que o procedimento de congelamento e descongelamento adotado neste experimento de forma geral para todos os envases/volumes, foi específico para o envase palheta de volume 0,5 mL, favorecendo-a e que o macrotubo por ter um maior diâmetro que a palheta apresenta piores condições de criopreservação.

Quanto à integridade de membrana avaliada com iodeto de propídio, as amostras congeladas em pequenos volumes mantiveram melhor a integridade de membrana quando comparada com as amostras congeladas em recipientes cilíndricos de grandes volumes (Figura 14).

Os espermatozóides armazenados e congelados em MAC4mL apresentaram a pior integridade e funcionalidade de membrana quando comparados com a PAL0,5mL demonstrando, que este recipiente por sua forma cilíndrica e maior volume, oferece as piores condições de criopreservação, estes resultados são compatíveis com os descritos por Fiser e Fairfull (1990) e Eriksson e Rodriguez-Martinez (2000a); eles atribuem estes resultados a que, a velocidade de descongelamento do centro da dose, mantida em macrotubos, é , 3,7 vezes menor que a observada na periferia, portanto, existe uma variação de temperatura entre a periferia e o centro deste e concluíram que o tipo de recipiente de armazenamento tem uma influência sobre a qualidade dos espermatozóides viáveis pós-descongelamento. Os recipientes de armazenamento devem propiciar velocidades de congelamento e descongelamento que sejam uniformes (HOFMO e ALMLID, 1991) permitindo assim, um maior número de espermatozóides viáveis pós-descongelamento.

Segundo Watson (2000), o processo de criopreservação pode reduzir a capacidade fertilizante por injúrias à membrana plasmática, perda ou dano acrossomal, deterioração da função mitocondrial e perda da motilidade, sendo estes irreversíveis ou até letais.

Segundo Nascimento *et al.* (2008), baixas concentrações espermáticas aumentam a porcentagem de membrana plasmática íntegra. No presente trabalho a concentração espermática foi igual para todos os recipientes experimentais empregados, variando o volume e o tipo de recipiente (com relação ao material utilizado e sua forma), que leva a crer que estas duas variáveis foram responsáveis, pelos diferentes resultados obtidos, dos parâmetros aqui analisados.

O FB4,0mL apresentou valores de MT, MP, funcionalidade e integridade de membrana iguais aos apresentados pela palheta no tempo 0, e no decorrer do tempo ele manteve melhor as características do que o FB0,5mL. Comparando o número total de espermatozóides por recipiente plano, o FB4,0mL, foi o que preservou uma maior quantidade de espermatozóides com capacidade fertilizante. Embora os valores de VCL, VAP e VSL tenham sido menores em cada um dos tempos é provável que ao descongelar este mesmo volume modificando a temperatura e o tempo de descongelamento, segundo o recomendado por Eriksson e Rodriguez-Martinez (2000a), estes valores possam melhorar.

É provável que as dimensões utilizadas para os volumes de 4,0 e 0,5 mL não tenham sido apropriadas, pois não permitiram uma menor espessura, permitindo assim um melhor congelamento e descongelamento.

A temperatura e o tempo de descongelamento para os recipientes planos e o MAC4mL, não foram os adequados para obter resultados semelhantes com os reportados por outros autores.

É importante definir uma taxa de resfriamento, congelamento-descongelamento, dependendo do volume e do tipo de recipiente utilizado para congelamento de forma que seja apropriada para cada um dos recipientes. Existem fatores que influenciam no descongelamento da amostra como o tipo de envase, quanto à condutividade do calor e espessura da parede e a temperatura da água do banho-maria (AMANN e PICKETT, 1987). Corroborando isto, Cochram *et al.* (1984), concluíram que a temperatura de descongelamento dependerá do tipo de envase e do processo de congelamento propriamente dito, portanto, aqueles processos que utilizam curva de resfriamento rápido exigem descongelamento rápido e em outros realizados com curva lenta de resfriamento devem-se utilizar taxas de descongelamento lento (GRAHAM, 1996). O descongelamento do sêmen é dependente do tipo de armazenamento e taxa de resfriamento utilizado. Sêmen armazenado em palhetas de 0,5 mL são geralmente descongeladas a 37°C/30 segundos, entretanto, outros laboratórios recomendam descongelar palhetas de 0,5 mL a 75°C/7segundos. Sêmen congelado em palhetas de 4 ou 5 mL são geralmente descongeladas a 50°C/45segundos (SAMPER, 2000).

## 6. CONCLUSÕES

Os tipos de recipientes e volumes utilizados tiveram influência sobre os resultados obtidos, para cada uma das variáveis avaliadas.

Pode-se dizer que os “FlatBags” oferecem uma alternativa viável e prática (devido ao volume), para o congelamento de sêmen equino e que melhores resultados podem ser esperados modificando-se as curvas de congelamento e descongelamento.

## REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M.A. Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões. Tese (livre-docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Paulista do Estado de São Paulo, Botucatu. 87 p. 2002.

ALVARENGA, M. A; LANDIM-ALVARENGA, F. C; MOREIRA, R. M; CESARINO, M. M. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Veterinary Journal*, 32: 541-545. 2000.

ALVARENGA, M. A; PAPA, F.O; LANDIM-ALVARENGA F.C; MEDEIROS A.S.L. Amidas as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci*, 89:105-113. 2005.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Sci*, 7:145-173. 1987.

BECKMAN, J., KORBER CH., RAU, G., HUBEL, A., CRAVALHO, E. G. Redefining cooling rates in terms of ice front velocity and thermal gradient: First evidence of relevance to freezing injury of lymphocytes. *Cryobiology* 27, 279-287. 1990.

BERGERON A, CRETE MH, BRINDLE Y, MANJUNATH P. Low-density lipoprotein fraction From hen`s egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal Plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol reprod*; 70:708-717, 2004.

BERGERON, A., MANJUNATH, P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction And Development*, v. 73, p.1338-1344. 2006.

BWANGA, C.O.; DE BRAGANCA, M.M.; EINARSSON, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryopreservation of boar semen in Mini- and Maxi-straws. *J. Vet. Med. A*. 37 (9), 651–658, 1990.

BYRNE, G.P., LORERGAN, P., WADE, M., DUFFY, P., DONOVAN, A., HANRAHAN, J.P., BOLAND, M.P. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Reprod. Scien* v.62 p. 265-275. 2000.

CELEGHINI, E. C. C. Effects of bovine semen cryopreservation on sperm plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes and chromatin structure using fluorescent probes. Efeitos da criopreservação do semen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2005.

CHENIER, T. *et al.* Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. Proceedings for Annual Meeting, Society for *Theriogenology*. *Anais...*, 52-53, 1998.

COCHRAN, J.D., AMANN, R.P., FROMAN, D.P., PICKETT, B.W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility. *Theriogenology*, 22: 25-38. 1984.

COTORELLO, A.C.P.; HENRY, M.; FERREIRA, M.K.V. *et al.* Efeito da associação do etilenoglicol na criopreservação de sêmen equino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 456-457. 2001.

COURTENS, J.L.; PAQUIGNON, M. Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of the boar. In: Johnson, L.A., Larsson, K. (Eds.), *Deep Freezing of Boar Semen*. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, pp. 61–87, 1985.

COURTENS, J. L., RETY, J. M. Numerical simulation for freezing and thawing mammalian spermatozoa. Evaluation of cell injuries at different depths in bags or straws during all steps of the technique, *Genet. Sel Evol.* V.33 p. 83-104. 2001.

DELL`AQUA JUNIOR, Efeito de centrifugação, tipos de envase e temperatura de congelamento sobre parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local da deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado equino. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Área de Reprodução Animal) – Botucatu-SP, Universidade Estadual Paulista UNESP-Campus Botucatu, 81p. 2002.

EKWALL, H., ERIKSSON, B. M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryo-EM of frozen boar semen, Proc. of the Annual Meeting of the Royal Microscopy Society, "Low temperature microscopy and analysis, York, UK, pp. P-2. 1997.

EKWALL, H.; HERNÁNDEZ, M.; SARAVIA, F.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of boar sêmen frozen in médium-straws and MiniFlatpacks. *Theriogenology* 67; 1463-1472. 2007.

EKWALL, H. Cryo-scanning electron microscopy discloses differences in dehydration of frozen boar sêmen stored in large containers. *Reprod. Dom. anim.* 44 (1): 62-68. 2009.

ERIKSSON, B. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Deep-Freezing of Boar Semen in Plastic Film "Cochettes". *J. Vet. Med. A* 47, 89-97, 2000.

ERIKSSON, B. M., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and maxi-straws. *Anim Reprod Sci* 63: 205-20. 2000a.

ERIKSSON, B. M., VASQUEZ, J. M., MARTINEZ, E. A., ROCA, J., LUCAS, X., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and *in vitro* oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* 55 (8):1593-1605. 2001.

ERIKSSON, B. M., PETERSSON, H., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Field fertility with exported boar sêmen frozen in the new FlatPack container. *Theriogenology* 58: 1065-1079. 2002.

FAGUNDES, B.; VAN TILBURG, M.F.; SILVA, J.F.S.; SHIMOYA, A.; BARRETO, M.A.P.; FERREIRA, V.M. Adição de insulina no meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador. *R. Bras. Zootec.*, v.39, n.2, p.273-278, 2010

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Mol. Reprod. Dev.* 25, 123-129, 1990.

GIRAUD, M. N., MOTTA, C., BOUCHER, D., GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 15 (10): 2160-2164. 2000.

GRAHAM, J.K. Response of spermatozoa to freezing. *In: Techniques for handling and utilization of transported cooled and frozen equine spermatozoa. Proceedings. Equine Sciences. Colorado State Univerity Fort Collins, Colorado. USA. 83-85p. 1995.*



GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. In Diagnostic techniques and assisted reproductive technology. Edited by E.L. Squires. Vet, Clinic. N. Amer., 4 (2):131-147. 1996.

GRAHAM, JK Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. In: Proceedings of the 14<sup>th</sup> international Congress on Animal Reproduction and Artificial insemination, 2000, Stockholm. Stockholm; ICAR. Pp. 307. (abstract). 2000.

GRANASY, L., PUSZTAI, T., BORZSONYI, T., WARREN, J.A., DOUGLAS, J.F. A general mechanism of polycrystalline growth. *Nat. Mater.* 3(9) p. 645-650. 2004.

HELLEMAN, C., LINDEMANN, G. Congelación de semen equino en pellets y pajuelas. *Archivos de Medicina Veterinaria*. Vol13, n.1, p.30. 1981.

HENRY, M., SNOECK, P.P.N., COTTORELLO, A.C.P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology* 58; 245-248. 2002.

HERNÁNDEZ, M., EKWALL, H., ROCA, J., VAZQUEZ, J. M., MARTINEZ, E., MARTÍNEZ, H., R. Cryo-scanning electron microscopy (Cryo-SEM) of semen frozen in medium-straws from good and sub-standard freezer AI-boars. *Cryobiology*, v.54, p. 63-70. 2007.

HOLT, W. V., NORTH, R. D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* V.78 p.445-457. 1986.

HOLT, W. V. Basic aspect of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* v.62, p.3-22. 2000.

HUBEL, A., CARVALHO, E. G., NUNNER, B., KORBER, C. Survival of directional solidified B-lymphoblasts under various crystal growth conditions. *Cryobiology* 29, 183-198. 1992.

ISHIGURO, H., AND RUBINSKY, B. Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology* 31, 483-500. 1994.

ISHIGURO, H., AND RUBINSKY, B. Influence of fish anti-freeze proteins on freezing of cell suspensions with cryoprotectant penetrating cells. *Int. J. Heat Mass Transfer* 41, 1907-1915. 1998.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Vet.*, v.10, p.156-65, 1994.

JULIANI, G.C.; HENRY, M. Efeito do glicerol, etilenoglicol, acetamida e leite desnatado na criopreservação de espermatozóides equinos. *Arq. Bras. Med. Vet.Zootec.*, v.60, n.5, p.1103-1109, 2008.

KATHIRAVAN, P., KALATHARAN, J., EDWIN M.J., VEERAPANDIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with *in vitro* fertility in zona-free hamster oocytes. *Animal Reproduction Science*. 104; 9-17. 2008.

KATHIRAVAN, P., KALATHARAN, J., KARTHIKEYA, K., RENGARAJAN, K. e KADIRVEL, G. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using coputer-aided system – A review. *Reprod. Dom. Anim.* 2010. Doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01603.x. ISSN 0936-6768.

KOUSHAFAR, H., PHAM, L., LEE, C., AND RUBINSKY, B. Chemical adjuvant cryosurgery with antifreeze proteins. *J. Surg. Oncol.* 66, 114-12. 1997.

KOUSHAFAR, H., AND RUBINSKY, B. Effect of antifreeze proteins on frozen primary prostatic adenocarcinoma cells. *Urology* 49, 421-425. 1997.

KUMAR, S., MILLAR, J.D., WATSON, P. F. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines, *Cryobiology* 46 p.246-253. 2003.

LOVELOCK, J. E. The haemolysis of human red blood-cells by freezing and thawing. *Biochim. Biophys. Acta* 10, 414-426. 1953.

MANN, K., MANN, M. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. *Proteomics* 8 p.178-191. 2008.

MARTIN, J.C., KLUG, E. GUNZEL, A. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. reprod. Fert., suppl.* 27: 47-51. 1979.

MARTINEZ, R., EKWALL, H. Eletron microscopy in the assessment of cryopreserved spermatozoa viability, *Microsc. Anal.* 65 p.11-13. 1998.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Dom. Anim.* 36: 49-55. 2001.

MAXWELL, W. M. C. Current problems and future potential of artificial insemination programmes in: Lindsay, D. R., Pearce, D. T. (Eds), *Reproduction in sheep. Australian Academy of Science and Australian Wool, Canberra*, 291-298. 1984.

MAZUR, P. Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science* 68, 939-949. 1970.

MAZUR, P. Freezing of living cells – mechanisms and implications, *Am. J. Physiol.* 247 (3) C125-C142. 1984.

MAZUR, P., RALL, W. F., RIGOPOULOS, N. Relative contributions of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Biophys. J.* 36, 653-665. 1981.

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

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMOS, M.T.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology*, 58:273-276. 2002.

MERYMAN, H. T. Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology* 8, 489-500. 1971.

MOFFET, P.D; BRUEMMER, J.E; CARD, C.; SQUIRES E. L. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. *In: Proceedings of the Society for Theriogenology Annual Conference, 2003, Columbus, OH. Lexington, KY: Society for Theriogenology. p. 42. 2003. (abstract).*

MORRIS, G. J., ACTON, E., AVERY, S. A novel approach to sperm cryopreservation. *Human Reproduction*. 14 no.4, 1013-1021. 1999.

MORTON, D.B., BRUCE, S.G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil. suppl.*39, p.311-316. 1989.

NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ALONSO, M.A.; CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P. Effects of sperm concentration and straw volume characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* V.28, n.6. 2008.

NEI, T. Mechanism of hemolysis of erythrocytes by freezing at near-zero temperatures. II. Investigations of factors affecting hemolysis by freezing. *Cryobiology* 4, 303-308. 1967.

NEI, T., AND TANNO, K. The mechanism of hemolysis by freezing at near zero temperatures. III. Some aspects of factors affecting hemolysis. *Low. Temp. Sci. Ser. B* 26, 91-97. 1968.

ORTMAN, K.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Membrane damage during dilution, cooling and freezing thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags, *J. Vet. Med. A* 41, 37-47, 1994.

ORTEGA-FERRULOSA, C., MACIAS, B., SUARES, V., GALLARDO-BOLAÑOS, J.M., GONZALEZ-FERNÁNDEZ, L., TAPIA, J.A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., and PEÑA, F.J. Identification of sperm subpopulation in stallion ejaculates: Changes after cryopreservation and comparison with traditional statistics. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 419-423. 2009.

PEGG, D. E., AND DIAPER, M. P. The unfrozen factor hypothesis of freezing injury to human erythrocytes: A critical examination of evidence. *Cryobiology* 26, 30-38. 1989.

PEÑA, A.I. Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelación-descongelación. Lugo. Doctoral thesis, Universidad de Santiago de Compostela. 1997.

PHAM, L., DAHIYA, R. AND RUBINSKY, B. An in vivo study of antifreeze protein adjuvant cryosurgery. *Cryobiology* 38, 169-175. 1999.

POLGE, C., SMITH, A.U., PARKS, A.S. A removal of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, V. 164, p.666. 1949.

RICKER, J.V., LINFOR, J.J., DELFINO, W.J., KYSAR, P., SCHOLTZ, E.L., TABLIN, F., CROWE, J.H., BALL, B.A., MEYERS, S.A. Equine sperm membrane phase behavior: The effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol Reprod* 74:359-365. 2006.

RUBINSKY, B. "Directional solidification for controlled freezing of biomaterials," *U. S. Patent 4531373, July 30. 1985.*

RUBINSKY, B. AND IKEDA, M. A cryomicroscope using directional solidification for the controlled freezing of biological material. *Cryobiology* 22, 55-68. 1985.

RUBINSKY, B. AND DEVRIES, A. L. Effects of ice crystal habit on the viability of glycerol protected red blood cells. *Cryobiology* 26, 580. 1989.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of semen. *Animal Reproduction Science* v.26 p.77-111. 2000.

SAMPER, J.C. Equine breeding management and artificial insemination. W.B. Saunders Company. Cap 2, 8 e 9.

SARAGUSTY, J., GACITUA, H., ROZENBOIM, I., ARAV, A. Do physical forces contribute to cryodamage?. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 104, (4): 720-728. 2009.

SCHERZER, J., FARER-HOSKEN, R.A., ACEVES, M., HURLEY, D.J., RAY, L.E., JONES, L., AND HEUSNER, G.L. Freezing equine semen: the effect of combination of semen extenders and glycerol on post-thaw motility. *Australian Veterinary Journal*. v. 87 p.275-279. 2009.

SCHNEIDER, U., AND MAZUR, P. Relative influence of unfrozen fraction and salt concentration on the survival of slowly frozen eight cell mouse embryos. *Cryobiology* 24, 17-14. 1987.

SEARLES, J. A., CARPENTER, J. F., RANDOLPH, T. W. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf. *J. Pharm. Sci.* 90. 860-871. 2001.

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

SNOECK, P.P.N. Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. 2003. 116f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2003.

SONGSASEN, N., LEIBO, S. P. The ice nucleation temperature determines the primary drying rate of lyophilization for samples frozen on a temperature-controlled shelf, *Cryobiology* 35 p.240-254. 1997.

SOUZA, G.V.; MATTA, M.F.R.; MATTA, C.G.F. *et al.* Comparação de antibióticos pró-análise e comerciais adicionados ao diluente seminal glicina-gema na motilidade de espermatozoides de garanhões conservados a 5°C. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.2, n.3, p.450-451. 2001.

STEPONKUS, P. L., AND GORDON-KAMM, W. J. Cryoinjury of isolated protoplasts: A consequence of dehydration or the fraction of suspended medium that is frozen. *Cryo-Lett.* 6, 217-226. 1985.

TAKAMATSU, H. AND RUBINSKY, B. Viability of deformed cells. *Cryobiology* 39, 243-251. 1999.

VIDAMENT M., DAIRE C., YVON J.M., DOLIGEZ P., BRUNEAU B., MAGISTRINI M., ECOT P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology* 58; 249-251. 2002.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* V.7 p.871-891. 1995.

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

WOELDERS, H., MATTHIJS, A., ZUIDBERG, C. A., CHAVEIRO, A. E. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. *Theriogenology* 63, 383-395. 2005.

## ANEXOS

### ANEXO A

A seguir apresentam-se as equações de regressão para variável MT durante os três tempos avaliados (tempo 0 min, tempo 30 min e tempo 60 min) em cada um dos recipientes:

$$\text{PAL0,5mL: } \hat{Y} = 41,708 - 0,2730 \cdot X \text{ (P} < 0,0001 \text{ ; R}^2 = 0,190\text{)}$$

$$\text{MAC4,0mL: } \hat{Y} = 41,406 - 0,3114 \cdot X \text{ (P} < 0,0001 \text{ ; R}^2 = 0,233\text{)}$$

$$\text{FB0,5mL: } \hat{Y} = 47,056 - \mathbf{0,4590} \cdot X \text{ (P} < 0,0001 \text{ ; R}^2 = 0,549\text{)}$$

$$\text{FB4,0mL: } \hat{Y} = 43,705 - 0,3300 \cdot X \text{ (P} < 0,0001 \text{ ; R}^2 = 0,256\text{)}$$

Sendo:

$\hat{Y}$  = Motilidade total (%)

X = Tempo (min)

## ANEXO B

A seguir apresentam-se as equações de regressão para variável MP, durante os três tempos avaliados (tempo 0 min, tempo 30 min e tempo 60 min):

$$\text{PAL0,5mL: } \hat{Y} = 29,281 - 0,1930 \cdot X \text{ (P} < 0,0001; \text{R}^2 = 0,171)$$

$$\text{MAC4,0mL: } \hat{Y} = 29,747 - 0,2211 \cdot X \text{ (P} < 0,0001; \text{R}^2 = 0,194)$$

$$\text{FB0,5mL: } \hat{Y} = 31,365 - \mathbf{0,2982} \cdot X \text{ (P} < 0,0001; \text{R}^2 = 0,377)$$

$$\text{FB4,0mL: } \hat{Y} = 30,326 - 0,2160 \cdot X \text{ (P} < 0,0001; \text{R}^2 = 0,186)$$

Sendo:

$\hat{Y}$  = Motilidade progressiva (%)

X = Tempo (min)



## ANEXO C

A seguir apresentam-se as equações de regressão para VCL durante os três tempos avaliados (tempo 0 min, tempo 30 min e tempo 60 min):

$$\text{PAL0,5mL: } \hat{Y} = 117,061 - 0,3480 \cdot X \text{ (P= 0.0001; R}^2\text{= 0,108 )}$$

$$\text{MAC4,0mL: } \hat{Y} = 108,160 - 0,3250 \cdot X \text{ (P= 0,0001; R}^2\text{= 0,104 )}$$

$$\text{FB0,5mL: } \hat{Y} = 112,082 - \mathbf{0,6180} \cdot X \text{ (P< 0,0001; R}^2\text{= 0,349 )}$$

$$\text{FB4,0mL: } \hat{Y} = 100,826 - 0,3761 \cdot X \text{ (P< 0,0001; R}^2\text{= 0,132 )}$$

Sendo:

$\hat{Y}$  = Velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ )

X = Tempo (min)

## ANEXO D

A seguir apresentam-se as equações de regressão para variável VAP, durante os três tempos avaliados (tempo 0 min, tempo 30 min e tempo 60 min):

$$\text{PAL0,5mL: } \hat{Y} = 68,367 - 0,2044 \cdot X \text{ (P= 0,0005; R}^2\text{= 0,082)}$$

$$\text{MAC4,0mL: } \hat{Y} = 62,964 - 0,1503 \cdot X \text{ (P= 0,0024; R}^2\text{= 0,063)}$$

$$\text{FB0,5mL: } \hat{Y} = 69,428 - \mathbf{0,3670} \cdot X \text{ (P< 0,0001; R}^2\text{= 0,334)}$$

$$\text{FB4,0mL: } \hat{Y} = 61,937 - 0,2580 \cdot X \text{ (P< 0,0001; R}^2\text{= 0,142)}$$

Sendo:

$\hat{Y}$  = Velocidade média do trajeto ( $\mu\text{m/s}$ )

X = Tempo (min)

## ANEXO E

A seguir apresentam-se as equações de regressão para variável VSL, durante os três tempos avaliados (tempo 0 min, tempo 30 min e tempo 60 min):

$$\text{PAL0,5mL: } \hat{Y} = 53,484 - 0,1273 \cdot X \text{ (P= 0,0066; R}^2\text{= 0,050 )}$$

$$\text{MAC4,0mL: } \hat{Y} = 48,796 - 0,0548 \cdot X \text{ (P= 0,1549; R}^2\text{= 0,014 )}$$

$$\text{FB0,5mL: } \hat{Y} = 55,450 - \mathbf{0,2770} \cdot X \text{ (P< 0,0001; R}^2\text{= 0,263 )}$$

$$\text{FB4,0mL: } \hat{Y} = 49,173 - 0,1780 \cdot X \text{ (P< 0,0001; R}^2\text{= 0,131)}$$

Sendo:

$\hat{Y}$  = Velocidade progressiva ( $\mu\text{m/s}$ )

X = Tempo (min)