

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA E DA
METODOLOGIA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM
SÊMEN EQUINO CONGELADO**

BRUNO RIBEIRO AVANZI

Botucatu - SP
Janeiro 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA E DA
METODOLOGIA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM
SÊMEN EQUINO CONGELADO**

BRUNO RIBEIRO AVANZI

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu para a
obtenção do título de Mestre em
Medicina veterinária, Área de
Reprodução Animal

Orientador: Prof. Titular Frederico Ozanam Papa

Botucatu - SP
Janeiro 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Avanzi, Bruno Ribeiro.

Efeito da concentração espermática e da metodologia de inseminação artificial com sêmen eqüino congelado / Bruno Ribeiro Avanzi. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2010

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino - Reprodução 2. Inseminação artificial

Palavras-chave: Concentração; Eqüino; Garanhão; Inseminação artificial; Sêmen

Nome do autor: Bruno Ribeiro Avanzi

Título: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA E DA METODOLOGIA
DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN EQÜINO CONGELADO

15 de Janeiro de 2010

Comissão Examinadora:

Prof. Titular Frederico Ozanam Papa

Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior

Prof. Associado Rubens Paes de Arruda

“Veja em cada dificuldade um desafio, um degrau e jamais
conhecerá a derrota” (Eileen Caddy)

“Uma idéia pode virar pó ou mágica, dependendo do talento que
esbarra com ela” (William Bernbach)

“Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total, buscar
seu último limite e dar o melhor de si mesmo” (Ayrton Senna)

“Sucesso é a soma de pequenos esforços, repetidos o tempo todo”
(Robert Collier)

Dedico este trabalho

a Deus;

e às pessoas que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado, de forma incondicional mesmo nos momentos mais difíceis, meus pais Sebastião e Mara, meus avós paternos Sebastião e Iolanda e maternos Edson e Odaídes e minha namorada Renata.

Vocês sabem o quanto foi dura e árdua a realização desta jornada.

Espero que eu consiga retribuir um pouco do amor e dedicação que vocês me deram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo modo que se desenvolveu este trabalho, contribuindo de maneira imensurável para minha formação profissional e pessoal.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP- Campus de Botucatu, pela oportunidade de crescimento na vida profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de Mestrado e pelos Auxílios que possibilitaram a execução de todos os nossos trabalhos.

À empresa Biotech Botucatu pelo fornecimento de produtos para a execução dos experimentos.

Ao Prof. Frederico Ozanam Papa pela oportunidade, ensinamentos e confiança durante a nossa convivência desde a iniciação científica no período de graduação.

Ao Prof. Marco Antonio Alvarenga pela convivência, ensinamentos e por acreditar e me incentivar a ir atrás dos meus objetivos.

Ao Doutorando Marcílio Nichi e à Prof.^a Valquíria Barnabé do Departamento de Reprodução Animal da Universidade de São Paulo pela ajuda e disponibilidade para execução dos ensaios de estresse oxidativo.

Aos Profs. Luzia e Francisco pela atenção, disponibilidade e paciência durante a realização das análises estatísticas.

Ao Prof. Nicolau pela amizade, atenção, respeito e confiança.

Aos Professores Nereu e Denise pela amizade e ensinamento.

Aos docentes do Departamento de reprodução Animal: Prof.^a Fernanda, Prof. Sony, Prof.^a Eunice, Prof. Meira e Prof. João pela convivência harmoniosa e disponibilidade sempre que necessário.

Aos meus “tutores” Cely e Zé que na ausência do Prof. Papa estavam presentes para direcionar o andamento dos trabalhos desde a iniciação científica.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Miguel, Walter, Edílson, Dona Raquel, Dona Cida, Cristina e Zé por toda ajuda, colaboração e descontração.

Aos funcionários da Pós-Graduação: Zé, Denise e Maria pela atenção e ajuda.

Aos funcionários da biblioteca pela ajuda nas pesquisas bibliográficas e requisições de trabalhos.

A toda minha família pelo apoio e dedicação durante esses anos em Botucatu.

A minha namorada Renata, que mais do que meu amor, foi uma verdadeira companheira, se dispondo a aprender e praticar a área da reprodução de eqüinos.

Aos meus amigos e parceiros Carmo, Eduardo, Gabriel, Marcel, Cláudia e Hugo pela convivência além dos muros da faculdade.

Aos companheiros e colegas de pós-graduação André, Gustavo, Héder, Moisés, Márcio, Luciana, Camila, Luis, Rosiara, Bió, Priscila, Wolff, Mateus, Daniel, Gabriel Felício, Rodrigo, Ana Izabel, Carla, Bruna, Ieda, Ian, Daniela, Rodrigo e Gabriel Monteiro pela convívio e trocas de idéias.

Por fim, aos garanhões e éguas envolvidos neste experimento, pelo aprendizado que acumulei durante a lida com eles.

LISTA DE TABELAS

Artigo I

Tabela 1: Médias de quadrados mínimos com respectivos erros padrão e equações de regressão das variáveis analisadas pós-descongelamento nas amostras de sêmen equino criopreservadas em diferentes concentrações espermáticas (100×10^6 , 200×10^6 e 400×10^6 de espermatozoides totais/ml).....	21
--	----

Artigo II

Tabela 1: Médias e desvios padrão das características seminais analisadas pós-descongelamento nas amostras de sêmen dos garanhões A e B.....	39
Tabela 2: Taxas de fertilidade dos garanhões A e B para inseminação pós-ovulação e inseminação 24 e 40 horas pós-indução da ovulação.....	40
Tabela 3: Porcentagem de acúmulo de líquido intra-uterino nas éguas inseminadas com o método pós-ovulação ou a 24 e 40 horas pós-indução da ovulação.....	40
Tabela 4: Intervalo médio entre a indução e a ovulação nas éguas inseminadas com o método pós-ovulação ou a 24 e 40 horas pós-indução da ovulação.....	41

LISTA DE FIGURAS

Artigo I

Figura 1: Curva da equação de regressão correspondente ao efeito logarítmico da concentração na variável motilidade total (MT) no sêmen equino descongelado.....	22
Figura 2: Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável motilidade progressiva (MP) no sêmen equino descongelado.....	22
Figura 3: Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP) no sêmen equino descongelado.....	23
Figura 4: Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável velocidade progressiva (VSL) no sêmen equino descongelado.....	23
Figura 5: Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável velocidade curvilínea (VCL) no sêmen equino descongelado.....	24
Figura 6: Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável frequência de batimento flagelar (BCF) no sêmen equino descongelado.....	24
Figura 7: Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável espermatozoides rápidos (RAP) no sêmen equino descongelado.....	25

Artigo II

Figura 1: Distribuição do intervalo de detecção da ovulação para os ciclos de inseminação dentro do intervalo de 6 horas pós-ovulação (n=29).....41

Figura 2: Distribuição do intervalo de detecção da ovulação para os ciclos de inseminação a 24 e 40 horas pós-indução da ovulação (n=29).....42

Figura 3: Distribuição do intervalo de detecção da ovulação para todos os ciclos inseminados (n=58).....42

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Célula espermática.....	03
2.2 Criopreservação de sêmen eqüino.....	04
2.2.1 Concentração e sêmen congelado.....	07
2.2.2 Variabilidade entre indivíduos.....	08
2.3 Avaliação da qualidade seminal pós-descongelção.....	09
2.3.1 Motilidade espermática.....	09
2.3.2 Integridade da membrana plasmática.....	10
2.3.3 Estresse oxidativo.....	11
2.4 Inseminação artificial com sêmen congelado.....	14
2.5 Fertilidade com sêmen congelado.....	15
3. TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	15
3.1 Artigo i.....	15
3.2 Artigo ii.....	33
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS.....	56
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO.....	66

AVANZI, B.R. **Efeito da concentração espermática e da metodologia de inseminação artificial com sêmen equino congelado**. 2010. 66f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Resumo

A utilização de sêmen criopreservado na reprodução de eqüinos depara-se com obstáculos como: variabilidade entre garanhões e ejaculados ao processo de criopreservação, taxas de prenhez inferiores ao sêmen fresco e refrigerado, manejo mais trabalhoso e oneroso das éguas e ausência de padrões de qualidade na distribuição e comercialização do sêmen. Neste trabalho foram realizados dois experimentos, no qual primeiramente, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações espermáticas em palhetas de 0,5 mL (100 , 200 e 400×10^6 de espermatozoides totais/mL) sobre algumas variáveis de qualidade seminal pós-descongelação como: parâmetros de cinética espermática através de análise computadorizada, integridade de membrana plasmática e resistência à peroxidação lipídica. Posteriormente, realizou-se um estudo comparativo entre a inseminação pós-ovulação e a inseminação em tempo pré-determinado, avaliando-se os resultados de concepção e acúmulo de fluido intra-uterino pós-inseminação. Ao empregar a metodologia de inseminação pós-ovulação, realizou-se uma única inseminação dentro do intervalo de até 6 horas pós-ovulação com 800×10^6 de espermatozoides totais e para o método programado, realizaram-se duas inseminações após 24 e 40 horas pós-indução da ovulação, com 400×10^6 de espermatozoides totais cada. Foi observado efeito significativo da concentração espermática ($p < 0,05$) sobre algumas variáveis de cinética espermática como: motilidade total, motilidade progressiva, velocidade ao longo de uma trajetória média, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, frequência de batimento flagelar e espermatozoides rápidos, com superioridade para a criopreservação em concentrações mais baixas. No entanto, para as variáveis de integridade de membrana plasmática e resistência à peroxidação lipídica não foram evidenciados efeitos significativos. Em relação aos métodos de inseminação, não verificou-se efeito significativo ($p > 0,05$) sobre as taxas de prenhez entre uma inseminação pós-ovulação e duas inseminações a 24 e 40 horas pós-indução da ovulação (41,4% e 51,7%, respectivamente). Entretanto, de forma

inesperada, a realização de apenas uma inseminação pós-ovulação resultou em uma porcentagem significativamente ($p < 0,05$) maior de acúmulo de líquido intra-uterino após 24 horas da inseminação em relação ao protocolo com duas inseminações “programadas” (58,6% e 34,0%, respectivamente). Assim, de acordo com os resultados obtidos neste experimento, houve um efeito benéfico da utilização de menores concentrações espermáticas por unidade de volume sobre várias características de cinética espermática. Adicionalmente, verificou-se que a adoção de um protocolo visando praticidade no manejo de inseminação não afetou os resultados obtidos.

Palavras-chave: equino, sêmen, garanhão, inseminação artificial, concentração

AVANZI, B.R. **Effect of sperm concentration and at the artificial insemination methodology with equine frozen semen.** 2010. 66f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Abstract

The cryopreserved semen application in equine reproduction appears with obstacles as variability between stallions and ejaculates at the cryopreservation process, lower pregnancy rates compared to the fresh and cooled semen, harder and onerous mares' management and absence of quality pattern in distribution and semen commercialization. In this study were realized two experiments which one, firstly, was evaluated the effect of different sperm concentrations in straws of 0.5 mL (100 , 200 and 400×10^6 total sperm/mL) over some variables of seminal quality after thaw as: parameters from sperm kinetics by computer analysis, plasmatic membrane integrity and resistance to lipid peroxidation. Subsequently, it was realized a comparative study between the insemination after ovulation and the insemination in fixed-time, evaluating the results of conception and intrauterine fluid collection after insemination. When the methodology of insemination after ovulation was employed, it was realized a single insemination during the interval of 6 hours after ovulation with 800×10^6 total spermatozoa and for the programmed method, two inseminations with 400×10^6 doses of total spermatozoa each one, were done after 24 and 40 hours after induction of ovulation. It was observed significant effect from sperm concentration ($p < 0,05$) over some variables of sperm kinetics like: total motility, progressive motility, velocity in the average path velocity, straight line velocity, curvilinear velocity, beat cross frequency and rapid spermatozoa, with superiority for cryopreservation in lower concentrations. However, for the variables of plasmatic membrane integrity and resistance to lipid peroxidation were not observed significant effects. In respect to the insemination methods, it was not observed significative effect ($p < 0.05$) over the pregnancy rates between one insemination after ovulation and two inseminations in 24 and 40 hours after induction of ovulation (41,4% e 51,7%, respectively). However, at an unexpected form, the achievement of only one insemination after ovulation resulted in a percentage significantly higher of intrauterine fluid storage after 24 hours from the insemination in relation to the protocol with two "programmed"

inseminations (58,6% e 34,0%, respectively). Therefore, in accordance with the results obtained at this experiment, there was a benefic effect from utilization of lower sperm concentrations per unit of volume over many characteristics of sperm kinetics. Additionally, it was verified that the adoption of a protocol that aims at less labor in insemination management doesn't affect the results obtained.

Key words: equine, semen, stallion, artificial insemination, concentration

1. Introdução

Os negócios que envolvem a criação e utilização do cavalo ocupam uma posição de destaque nos países desenvolvidos e em muitos daqueles em desenvolvimento, como o Brasil (CEPEA, 2006).

O Complexo do Agronegócio Cavalo no Brasil possui uma importância social e econômica traduzida por uma movimentação financeira da ordem de R\$ 7,3 bilhões por ano e a ocupação direta de cerca de 640 mil pessoas, cifra que poderia atingir a casa de 3,2 milhões se forem incluídos os empregos considerados indiretos (CEPEA, 2006).

Embora o principal uso do cavalo seja como animal de trabalho, atualmente há um crescimento na participação do cavalo de lazer na tropa nacional. Diversas modalidades de esportes eqüestres têm apresentado expressivo crescimento no Brasil, pois ao tomar como exemplo a Federação Paulista de Hipismo – FPH, o crescimento do número de eventos foi de 315% nos últimos cinco anos (CEPEA, 2006).

Deve-se destacar que para os animais destinados às praticas desportivas ou tratados como “produtos”, os cuidados tendem a ser mais intensos, demandando maior consumo de insumos e serviços. Atualmente, o plantel nacional de cavalos de raça passou a ter animais reconhecidos internacionalmente, refletido no número de animais vivos exportados e nos valores captados, que passaram de cerca de US\$ 260 mil, em 1996, para valores superiores a US\$ 2 milhões, em 2005. Cabe ressaltar também que, entre o período dos anos de 1990 a 2004, além de haver um aumento no número de animais exportados, também registrou-se uma diminuição no número de animais importados, ou seja, a qualidade do rebanho de animais de raça vem melhorando a cada ano (CEPEA, 2006).

Sabe-se que uma das ferramentas responsáveis pelo incremento da criação nacional é o melhoramento genético, sendo que a biotecnologia da reprodução em eqüinos, através da maximização do aproveitamento do potencial genético de animais de alto padrão, é uma área que vem

conquistando cada vez mais espaço dentro da equinocultura nacional e mundial.

Atualmente, técnicas de reprodução assistida como a inseminação artificial, transferência de embriões, criopreservação de gametas e embriões, fertilização *in vitro*, transferência intra-falopiana de gametas e inseminação intracitoplasmática tem impulsionado pesquisas com o objetivo de aperfeiçoar a aplicabilidade de tais técnicas e incrementar os índices obtidos a campo.

Relata-se que em eqüinos a primeira congelação de sêmen bem sucedida ocorreu em 1950. No entanto, somente em 1957 que Barker e Gandier relataram a primeira concepção decorrente de inseminação com sêmen congelado.

Dentre as várias vantagens no uso de sêmen congelado destaca-se: éguas e potros não precisam ser transportados até os garanhões; a ansiedade e problemas de logística associados com o sêmen refrigerado são eliminados; os garanhões podem participar de eventos durante a estação de coberturas; doenças, lesões ou óbitos não impedem a inseminação com sêmen desses animais; maior número de fêmeas acasaladas com determinado reprodutor; possibilidade de distribuição internacional; formação de um banco genético e disponibilidade deste por tempo indeterminado (SAMPER & HANKINS, 2001; LOOMIS, 2001; LOOMIS & SQUIRES, 2005).

Porém entre as desvantagens, destaca-se a grande variabilidade na qualidade do sêmen pós-descongelação entre os garanhões e as de taxas de prenhez inferiores quando comparado à monta natural e inseminação com sêmen refrigerado (SAMPER & HANKINS, 2001; LOOMIS, 2001).

Considera-se que a sanidade reprodutiva das éguas, a qualidade do sêmen utilizado e o manejo reprodutivo para cobertura estejam entre os principais fatores que influenciam os resultados nos programas de inseminação artificial com sêmen eqüino congelado.

Assim, o presente experimento avaliou o efeito de diferentes concentrações espermáticas sobre as variáveis de cinética espermática,

integridade da membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo sobre lipídios. Adicionalmente, realizou-se um estudo comparativo entre a inseminação dentro do período de 6 horas pós-ovulação e um protocolo de inseminação em tempo pré-determinado.

2. Revisão de literatura

2.1 Célula espermática

Os espermatozóides são células altamente especializadas que armazenam e transportam o material genético, possuindo as habilidades de motilidade ativa e fertilização do ovócito (AURICH, 2005).

A composição da membrana plasmática espermática constitui-se de uma mistura heterogênea de lipídios (fosfolipídios, glicolipídios e esteróis) e proteínas. No entanto, atualmente é reconhecido que a organização dos lipídios na membrana plasmática é muito mais complexa do que o modelo proposto por Singer & Nicolson em 1972, no qual lipídios e proteínas difundem livremente dentro de uma bicamada. Hoje é amplamente aceito que as membranas não são homogêneas, constatando-se a presença de assimetrias laterais e transmembrana. Conseqüentemente, os lipídios e proteínas estão arrançados em um mosaico de domínios (LADHA, 1998).

Tomando-se como modelo o espermatozóide, são encontradas cinco regiões especializadas: acrossomal, equatorial, pós-acrossomal, peça intermediária e peça principal. Cada uma destas regiões apresenta funções fisiológicas diferenciadas, de modo que a composição lipídica e protéica da membrana destes segmentos está relacionada com uma estrutura adequada para o desenvolvimento de determinadas funções (LADHA, 1998).

Os fosfolipídios são os principais lipídios encontrados na membrana plasmática do espermatozóide, destacando-se a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolina e esfingomielina. Entre os esteróis, o colesterol é o mais abundantemente encontrado. No caso dos glicolipídios, destaca-se o SGa1AAG (LADHA, 1998).

Após a espermatogênese, a célula espermática perde a maioria de suas organelas e a capacidade de transcrição de DNA, de forma que a re-síntese de componentes da membrana torna-se impossível. Como consequência, danos à membrana plasmática espermática podem resultar em perda irreversível de motilidade e/ou capacidade fertilizante (AURICH, 2005). Adicionalmente, alguns autores sugerem haver uma resistência distinta entre os diferentes compartimentos da célula espermática aos processos de refrigeração e congelamento (PARKS & GRAHAM, 1992).

Para a fertilização do ovócito, a célula espermática deve possuir atributos como metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, integridade das membranas (plasmática e acrossomal) e funcionalidade das proteínas relacionadas com os eventos da fertilização (SQUIRES *et al.*, 1999).

2.2 Criopreservação do sêmen equino

Com a aceitação do uso de sêmen congelado por muitas associações de raça na última década, houve uma renovação e estímulo a pesquisas sobre protocolos para congelamento de sêmen de garanhões (ALVARENGA *et al.*, 2005).

No entanto, na espécie eqüina, a biotecnologia de criopreservação do sêmen se depara com a grande variação entre garanhões e ejaculados de um mesmo garanhão em resistir aos fenômenos físicos-químicos inerentes à congelamento. Em vista disso, muitos estudos têm buscado aumentar a eficiência do processo de congelamento através do aperfeiçoamento de diluentes, protocolos de processamento do sêmen e metodologias de inseminação (DE VITA, 2008).

Alvarenga *et al.* (2005) afirmaram que a indústria eqüina utilizará o sêmen congelado em larga escala somente quando a fertilidade deste for melhorada. Dessa forma, vários procedimentos são testados a fim de incrementar a qualidade seminal pós-descongelamento.

A sobrevivência espermática à criopreservação requer a solução de uma equação multifatorial, sendo que a preservação de componentes celulares

como membrana plasmática, acrossomo, mitocôndria, citoesqueleto, núcleo e glicocalix são fatores incluídos neste processo (GRAHAM, 1996).

De acordo com Watson (2000) e Medeiros (2003) o processo de criopreservação expõe as células a temperaturas não fisiológicas, estresse osmótico, estresse oxidativo e formação de cristais de gelo, os quais afetam a homeostase celular e comprometem os compartimentos celulares.

Entre os efeitos advindos da criopreservação destaca-se a ocorrência de alterações na organização bi-dimensional dos lipídeos, na função das proteínas das membranas e no metabolismo energético das células (HOLT, 2000; OEHINGER *et al.*, 2000; WATSON, 2000). Adicionalmente, há despolimerização de filamentos de actina e peroxidação lipídica e protéica (BALL, 2008).

A redução da temperatura resulta em alterações das propriedades físico-químicas das membranas, fazendo com que passam de um estado denominado de líquido cristalino para um estado de gel. Esta alteração é decorrente da reorganização lipídica e protéica dos componentes das membranas, deixando-as sujeitas a rupturas e sem a propriedade característica de permeabilidade seletiva (HAMMERSTED *et al.*, 1990).

Sabe-se também que quando uma solução contendo sais é resfriada abaixo do seu ponto de congelção, formam-se cristais de gelo compostos exclusivamente de água. Os sais presentes na solução permanecem em uma porção não congelada e conforme ocorre a redução da temperatura, aumenta-se a formação de cristais de gelo e elevam-se as concentrações de sais nos canais de solução não congelada, os quais abrigam as células espermáticas presentes no meio (GRAHAM, 1996).

Portanto torna-se indispensável a aplicação de procedimentos que evitem ao máximo lesões à célula espermática durante o processamento do sêmen para fins de armazenamento e inseminação artificial, já que o número de fatores capazes afetar a integridade da membrana plasmática aumenta nestas situações (AURICH, 2005).

Para atenuar os efeitos deletérios do processo de resfriamento, congelação e descongelação, vários procedimentos são adotados para, conjuntamente, atuarem na preservação celular (AMANN & PICKETT, 1987; KATILA 1997).

A maioria dos meios diluentes para congelação de sêmen contém uma fonte de lipoproteínas, através da incorporação de produtos do leite, gema de ovo ou uma combinação destes dois ingredientes, que auxiliam na estabilização das membranas durante os ciclos da congelação/dcongelação. Monossacarídeos (glicose ou frutose), dissacarídeos (sucrose ou lactose) e trissacarídeos (rafinose) também são comumente incorporados. Os dissacarídeos e trissacarídeos são açúcares não permeáveis, usados principalmente por suas propriedades osmóticas. Os monossacarídeos também possuem efeitos osmóticos, porém eles podem ser utilizados pelos espermatozóides como uma fonte de energia. Entre os crioprotetores penetrantes o glicerol é o crioprotetor universalmente utilizado, embora outros agentes estejam sendo empregados, como o dimetilsulfóxido, etileno glicol, metilformamida e dimetilformamida (VARNER, 2003). Outros componentes como EDTA, detergentes, tampões e antibióticos também são incluídos nos meios (COTORELLO & HENRY, 2002).

A incorporação de crioprotetores aos meios diluentes tem como intuito a proteção dos espermatozóides durante o ciclo de congelação/dcongelação. Uma gama de substâncias tem sido utilizada para fornecer proteção às células espermáticas (SQUIRES *et al.*, 1999).

Há uma divisão básica que classifica os crioprotetores em penetrantes e não-penetrantes. Os crioprotetores penetrantes são substâncias que atuam tanto no meio intra quanto no extracelular, sendo comumente utilizados os alcoóis (glicerol e etilenoglicol), dimetilsulfóxido (DMSO) e amidas (metilformamida e dimetilformamida) Já os crioprotetores não penetrantes são os açúcares, lipídeos e lipoproteínas que protegem a célula sem a necessidade de penetração, através de mecanismos osmóticos que induzem à desidratação celular e previnem a formação de gelo intracelular (AMANN & PICKETT, 1987; KEITH, 1998).

Embora os crioprotetores intracelulares sejam fundamentais para a sobrevivência espermática, eles podem exercer efeitos tóxicos com influência nas taxas de fertilidade. Entre os efeitos nocivos relatam-se o aumento da permeabilidade e indução da fusão da membrana plasmática; inibição da atividade enzimática; desnaturação de proteínas; alterações na interação da actina, polimerização da tubulina e associação dos microtúbulos; distúrbio no balanço bioenergético; associação com o glicocálix e proteínas da superfície celular (FAHY *et al.*, 1990; HAMMERSTEDT & GRAHAM, 1992; ROSSI *et al.*, 2003).

A utilização de diversos crioprotetores e combinações podem minimizar e controlar seus efeitos deletérios, possibilitando resultados mais satisfatórios de motilidade e viabilidade pós-descongelação com melhores taxas de concepção (MEDEIROS *et al.*, 2002; ROSSI *et al.*, 2003).

Desde a descoberta do glicerol como um agente crioprotetor eficiente, o sêmen de uma variedade de animais domésticos, de laboratório e silvestres, assim como do homem, tem sido congelado e usado para inseminação artificial, tornando o glicerol o crioprotetor rotineiramente utilizado (PARKS & GRAHAM, 1992; ALVARENGA *et al.*, 2005).

No entanto, cabe ressaltar que dados apresentados por Medeiros *et al.* (2007) demonstraram que as amidas são superiores ao glicerol em preservar a motilidade e a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides de equinos quando submetidos ao estresse osmótico. Acredita-se que a menor viscosidade associada ao menor peso molecular das amidas facilite a permeabilidade do crioprotetor através da membrana, evitando a formação de um gradiente osmótico.

2.2.1 Concentração e sêmen congelado

Há vários anos, estudos tratando do efeito da concentração espermática sob a viabilidade celular pós-descongelação têm sido publicados.

Especula-se que a utilização de altas concentrações espermáticas para a congelação possa ser prejudicial devido à limitação de canais que para

acomodar um número elevado de espermatozóides em tais amostras (GRAHAM, 1996).

Nascimento (2006) sugeriu que menores concentrações espermáticas tendem a manter um maior número de células viáveis devido à maior quantidade de nutrientes por célula.

Alguns trabalhos analisando variáveis de cinética espermática e integridade dos compartimentos celulares apontaram que a criopreservação em concentrações reduzidas pode ser um procedimento benéfico para os espermatozóides de eqüinos (HEITLAND *et al.*, 1996; LOOMIS & CLARK, 1998; CLULOW *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

No entanto, outros experimentos incluindo tanto análises laboratoriais como testes de fertilidade não observaram superioridade de tal procedimento (PAPA *et al.*, 1989; ANGOLA *et al.*, 1992; ARRUDA *et al.*, 1993; LEIPOLD *et al.*, 1998; BLANES *et al.*, 2005).

2.2.2 Variabilidade entre indivíduos

Dentre os animais das espécies domésticas, o cavalo é o que mais se assemelha aos humanos em se tratando de clínica reprodutiva, pois os cruzamentos raramente incluem a fertilidade como critério de seleção. Como resultado, há um número significativo de reprodutores com baixo desempenho reprodutivo ou subférteis (LOOMIS, 2006).

O critério para seleção de reprodutores geralmente tem como base o padrão racial e a performance atlética (AMANN & GRAHAM, 1993).

No levantamento realizado por Alvarenga *et al.* (1996), ficou claro a existência dos fatores racial e individual relacionados com resistência à congelação na espécie eqüina. Raças de salto (Hannoveriano, Holstainer e Trackner) apresentaram uma porcentagem maior de indivíduos tolerantes à criopreservação (80%) em relação às raças Mangalarga e Mangalarga Marchador (15%).

Em outro trabalho, Alvarenga (2002) reforçou sua hipótese ao demonstrar a maior susceptibilidade dos espermatozóides de garanhões da raça Mangalarga Marchador à criopreservação.

2.3 Avaliação da qualidade seminal pós-descongelação

Os testes laboratoriais têm como objetivo avaliar a integridade estrutural e funcional das células espermáticas. No entanto, a correlação entre esses ensaios e fertilidade é bastante variável devido à complexidade dos espermatozóides, metodologia de colheita de dados sobre fertilidade e ausência de padronização dos diversos tipos de análises (KATILA, 2001; GRAHAM & MOCÉ, 2005).

2.3.1 Motilidade espermática

A motilidade é um atributo necessário à célula espermática para o transporte, passagem pela junção útero-tubárica, liberação dos sítios de armazenamento no oviduto e penetração através das células que circundam o ovócito (AMANN, 1989). Apesar de ser um atributo importante, refletindo aspectos do metabolismo espermático, a motilidade deve ser avaliada em conjunto com outros parâmetros seminais para que a estimativa do potencial fertilizante do sêmen tenha valor (KATILA, 2001).

A avaliação da motilidade espermática através de microscopia óptica é um método rotineiramente empregado devido a facilidade e rapidez. No entanto, trata-se de uma avaliação subjetiva que pode ser influenciada pela experiência do examinador e qualidade do equipamento utilizado (VARNER, 2008). Samper et al. (1991) obtiveram uma baixa correlação entre motilidade e fertilidade do sêmen congelado ($r=0,32$).

Ferreira (2000) demonstrou haver uma alta correlação ($r=0,89$) entre as avaliações subjetiva e computadorizada da motilidade, concluindo que a avaliação subjetiva é um método seguro.

A análise computadorizada dos espermatozóides (CASA) é realizada mediante um aparelho composto por: um microscópio de contraste de fase, um

digitalizador de imagens e um computador, que permite a mensuração de várias características de cinética espermática, como motilidade total e progressiva, características de velocidade, frequência de batimento flagelar, deslocamento lateral de cabeça, retilinearidade, linearidade e porcentagem de espermatozóides rápidos (JASKO *et al.*, 1992).

Porém, os usuários deste sistema se deparam com a ausência de valores de referencia para as características analisadas e falta de padronização para as configurações do equipamento, sendo uma necessidade urgente o estabelecimento destes critérios (KATILA, 2001).

2.3.2 Integridade de membrana plasmática

A membrana plasmática tem uma função de barreira com permeabilidade seletiva, de forma que danos a esta organela podem resultar em desequilíbrio (perda da homeostase) e morte celular (AMANN & PICKETT, 1987).

Consequentemente a manutenção da integridade da membrana plasmática é de fundamental importância para a sobrevivência e fertilidade da célula espermática (PARKS & GRAHAM, 1992).

A utilização de sondas fluorescentes tornou-se importante pela capacidade de marcar estruturas celulares específicas ao avaliar integridade celular estrutural e funcional (CELEGHINI, 2005).

Existem várias técnicas de avaliação para detectar injúrias na membrana plasmática espermática. Dentre as rotineiramente utilizadas estão a combinação das sondas fluorescentes iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína. O modo de atuação destas sondas consiste no fato de que as células íntegras são permeáveis ao diacetato de carboxifluoresceína e impermeáveis ao iodeto de propídio. Dessa forma, ao penetrar na célula, o diacetato de carboxifluoresceína é deesterificado por esterases não específicas resultando em carboxifluoresceína livre que produz a fluorescência verde. As células com membrana lesada permitem também a entrada do

iodeto de propídio, o qual se liga ao DNA celular e produz a fluorescência vermelha (HARRISON & VICKERS, 1990).

2.3.3 Estresse oxidativo

As membranas espermáticas são caracterizadas por uma quantidade relativamente alta de ácidos graxos polinsaturados, tornando-as susceptíveis ao dano peroxidativo (PARKS & LYNCH, 1992; AITKEN, 1995).

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode ocorrer como uma consequência normal do metabolismo oxidativo ou resultar de mecanismos específicos de tipos celulares particulares, como o *burst* oxidativo dos leucócitos. Há 60 anos sugeriu-se que o estresse oxidativo poderia ser um fator importante nos transtornos da função espermática, no entanto, apenas recentemente a sua importância tornou-se mais aparente na função espermática normal e anormal. Atualmente, está claro que as EROs possuem um importante papel na função espermática normal e que um desequilíbrio tanto na produção como na degradação podem ter sérios efeitos adversos sobre o espermatozóide, sendo que os efeitos do estresse oxidativo são particularmente importantes no armazenamento espermático através de refrigeração ou criopreservação (BALL, 2008).

Os principais anti-oxidantes descritos no sêmen são a catalase, superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidases (GPx), havendo uma ampla variação entre espécies quanto à quantidade e importância desses anti-oxidantes no plasma seminal (BALL, 2008).

O plasma seminal dos eqüinos possui uma atividade relativamente maior de catalase e superóxido dismutase com uma significativa variação entre ganhões na atividade dessas enzimas. O espermatozóide parece ter uma limitada quantidade de anti-oxidantes, sendo o plasma seminal uma potente fonte desses agentes, com a função de proteger o espermatozóide ejaculado dos efeitos adversos das EROs. A remoção do plasma seminal durante o processamento do sêmen pode aumentar a susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo devido à remoção desses antioxidantes (BALL, 2008).

Além das enzimas antioxidantes, vários outros componentes do plasma seminal provavelmente neutralizam o estresse oxidativo no sêmen. Fatores como a albumina, urato, taurina, hipotaurina, piruvato, lactato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotionina estão presentes no plasma seminal e podem atuar como antioxidantes (DE LAMIRANDE & GAGNON, 1992). Uma quantidade relativamente menor de pesquisas tem sido conduzidas sobre a composição do plasma seminal e o papel dos antioxidantes de baixo peso molecular no sêmen eqüino, embora a avaliação da capacidade antioxidante total plasma seminal sugere que estes componentes possam constituir a maior parte da capacidade antioxidante do ejaculado (THIELE *et al.*, 1995).

A produção e EROs pelas células espermáticas parece ser decorrente da ação da NADPH espermatozóide específica (NOX5) presente na membrana plasmática da região da cabeça ou advir da mitocôndria espermática (SABEUR & BALL, 2006; SABEUR & BALL, 2007). Embora o ânion superóxido (O_2^-) parece ser o primeiro EROs gerado pelo espermatozóide, ele rapidamente reage para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é provavelmente o responsável pelo principal efeito citotóxico no espermatozóide (BAUMBER *et al.*, 2000; BALL *et al.*, 2001; BURNAUGH *et al.*, 2007). A geração de EROs eleva-se de forma significativa na presença de espermatozoides criolesados, não-viáveis ou morfológicamente anormais, particularmente caracterizados pela presença de gota citoplasmática proximal ou defeitos de peça intermediária (BALL *et al.*, 2001). Nestas condições, a geração de maiores quantidades de EROs é induzida principalmente pelo escape de elétrons da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, com subsequente redução de moléculas de oxigênio para formar o ânion superóxido (SAUBER & BALL, 2006).

O espermatozóide eqüino parece ser mais resistente à peroxidação de membrana do que de outras espécies. No entanto, a criopreservação aumenta a susceptibilidade da célula espermática à peroxidação lipídica, a qual é mais pronunciada na região da peça intermediária (BAUMBER *et al.*, 2000; NEILD *et al.*, 2005).

Danos as mitocôndrias do espermatozóide são um importante aspecto da criolesão ao espermatozóide eqüino durante a criopreservação. Avaliações morfológicas dos espermatozóides após a congelação/descongelação demonstram edema de peça intermediária, o qual representa distensão mitocondrial, sugerindo que as mitocôndrias espermáticas são um local importante de criolesão com potencial para distúrbios do metabolismo oxidativo normal, geração de EROs e indução de alterações apoptóticas (BALL, 2008).

Sob condições fisiológicas, uma produção menor de EROs é estimulada na presença de cálcio, sendo que a NOX5 parece ser o mecanismo provável. Esta baixa produção de EROs pelo espermatozóide eqüino é importante na indução da capacitação (BAUMBER *et al.*, 2003).

No entanto, o fato de baixas concentrações de EROs induzirem capacitação afetam a preservação espermática. Durante a criopreservação, os espermatozóides possuem concentrações de cálcio intracelular aumentada, elevada geração de EROs e reduzida capacidade antioxidante devido a remoção do plasma seminal. Estes fatores podem levar à capacitação prematura com subsequente redução da longevidade espermática. A criocapacitação resulta em alterações da membrana plasmática similares, porém não idênticas, às observadas durante a capacitação *in vitro* (BALL, 2008).

Ao desencadear a peroxidação lipídica, ocorre uma reação em cadeia com a formação de peróxidos de lipídeos que culminam com a formação dos aldeídos citotóxicos, malondialdeído e 4-hidroxinonenol. A peroxidação de lipídeos de membrana altera sua fluidez, prejudicando a habilidade de fusão e comprometimento exocitose acrossomal (AITKEN, 1995; BALL, 2008).

Uma das técnicas de avaliação do estresse oxidativo sobre lipídios no sêmen é a quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). De acordo com Zabludovsky *et al.* (1999), a técnica de TBARS dosa de forma indireta a quantidade de malondialdeído (subproduto da peroxidação lipídica) através de sua reação com o ácido tiobarbitúrico.

2.4 Inseminação artificial com sêmen congelado

No trabalho desenvolvido por Sieme et al. (2003) demonstrou-se que o período considerado ótimo para inseminação com sêmen congelado compreende a faixa de 12 horas antes a 12 após a ovulação. No entanto, muitos recomendam que a inseminação seja feita entre 12 horas antes e 4-8 horas após a ovulação (LOOMIS, 2001; SAMPER & HANKINS, 2001).

Assim, o intenso manejo das éguas a serem inseminadas com sêmen congelado contribui negativamente para a disseminação da técnica, pois geralmente há a necessidade de que as éguas sejam levadas a uma central ou que plantões noturnos sejam feitos pelos veterinários nas fazendas para garantir que a inseminação seja realizada dentro do intervalo considerado ótimo (LOOMIS & SQUIRES, 2005).

Por outro lado, tem-se recomendado o uso de um protocolo de inseminação em um momento pré-determinado, possibilitando um manejo menos trabalhoso e oneroso. Este protocolo envolve exames ultrassonográficos diários durante o estro, indução da ovulação com hCG ou deslorelina após a detecção de um folículo >35 mm e inseminações 24 e 40 horas pós-indução. De acordo com a literatura, ao empregar este protocolo de inseminação, as éguas que ovularem 18 – 52 horas após a administração do agente indutor de ovulação possuirão espermatozóides depositados no trato reprodutivo dentro de 12 horas antes ou 6 horas após a ovulação ou ambos (LOOMIS & SQUIRES, 2005).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a utilização do protocolo de inseminação “programada” é tão eficiente quanto à inseminação pós-ovulação (SQUIRES *et al.*, 2002; SQUIRES *et al.*, 2003; BARBACINI *et al.*, 2005). Porém, a maior parte dos estudos envolveu levantamentos de campo não especificando com clareza a qualidade do sêmen empregado, havendo uma carência de informações sobre o desempenho desta metodologia ao utilizar amostras de sêmen de garanhões com baixa fertilidade.

2.5 Fertilidade com sêmen congelado

De acordo com Melo (2005), há uma grande variação nos índices de fertilidade ao utilizar o sêmen congelado devido a fatores como: variabilidade entre raças, indivíduos e ejaculados; técnicas de inseminação; extensores; dose inseminante e número de inseminações. Desse modo, torna-se difícil e impreciso comparar os resultados de diferentes estudos, porém no extenso levantamento realizado pela autora os resultados de fertilidade encontraram-se na faixa de 0 a 75%.

3. Trabalhos científicos

3.1 Artigo I

Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas

1. Introdução

A biotecnologia de criopreservação do sêmen tem sido utilizada comercialmente há mais de meio século dentro da bovinocultura de leite, proporcionando grandes avanços neste segmento. Tal sucesso não tem sido observado na reprodução de eqüinos, provavelmente devido à ausência de seleção genética para características de fertilidade e resistência espermática à congelação em conjunto com fatores biofísicos e bioquímicos característicos dos espermatozóides da espécie eqüina (SAMPER & HANKINS, 2001; VARNER, 2003; LOOMIS & GRAHAM, 2008).

Enquanto um número crescente de associações de raça aprova o uso de sêmen congelado, a aplicação desta técnica vem se difundindo em passos muito mais lentos do que o sêmen refrigerado (LOOMIS, 2001).

Destacam-se entre as vantagens do uso do sêmen congelado a manutenção de éguas e potros em suas propriedades; ausência de fatores limitantes associados à logística para a distribuição do sêmen, como acontece com o sêmen refrigerado; possibilidade dos garanhões participarem de

eventos durante a estação de coberturas; realização de inseminações mesmo em decorrência de doenças, lesões ou óbitos dos garanhões; compatibilidade com distribuição internacional; formação de um banco genético e disponibilidade deste por tempo indeterminado (SAMPER & HANKINS, 2001; LOOMIS, 2001; LOOMIS & SQUIRES, 2005; LOOMIS & GRAHAM, 2008).

Por outro lado, entre as desvantagens há deficiências no estabelecimento de padrões de qualidade e controle das doses de sêmen comercializadas, grande variabilidade na qualidade do sêmen pós-descongelamento e taxas de prenhez inferiores quando comparadas à monta natural e inseminação com sêmen refrigerado para muitos garanhões (LEIPOLD *et al.*, 1998; SAMPER & HANKINS, 2001; LOOMIS, 2001; LOOMIS & GRAHAM, 2008). Considera-se que a taxa de prenhez por ciclo ao utilizar doses de sêmen congelado encontra-se no intervalo de 30-40% (SAMPER, 2001).

Os processos de congelamento e descongelamento provocam, entre outras alterações, desestabilização das membranas devido à reorganização e perda de lipídios conjuntamente com peroxidação lipídica em decorrência da ação de espécies reativas de oxigênio. Esses eventos podem afetar funções espermáticas como motilidade, resposta ao estresse osmótico e mecanismos de sinalização, comprometendo a habilidade dos espermatozóides de alcançarem, ligarem e reagirem com a zona pelúcida (RICKER *et al.*, 2006).

Atualmente, não há padronização de um protocolo para congelamento de sêmen equino, tornando-se tendência a adoção de protocolos individuais para cada garanhão (LOOMIS & GRAHAM, 2008). Dentre variações nos procedimentos encontra-se o número de espermatozóides envasados por unidade de volume (20 a 1600×10^6 de espermatozóides/mL). Porém, alguns estudos avaliando o efeito da concentração espermática sobre a viabilidade celular pós-descongelamento, demonstraram resultados divergentes (PAPA *et al.*, 1989; ANGOLA *et al.*, 1992; ARRUDA *et al.*, 1993; HEITLAND *et al.*, 1996; LEIPOLD *et al.*, 1998; LOOMIS & CLARK, 1998; BLANES *et al.*, 2005; CLULOW *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

A utilização de altas concentrações espermáticas para a congelação pode ser prejudicial devido a limitação de canais que possam acomodar um número elevado de espermatozóides em tais amostras (GRAHAM, 1996). Contudo, o emprego de altas concentrações espermáticas para o acondicionamento das amostras de sêmen congelado torna-se interessante por proporcionar a utilização de um número menor de palhetas por dose inseminante e facilitar o procedimento de inseminação artificial (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Por outro lado, biotecnologias emergentes como a sexagem espermática e inseminações com dose reduzida se beneficiariam de procedimentos que maximizassem o potencial fertilizante de amostras criopreservadas com um número reduzido de células espermáticas (CLULOW *et al.*, 2008).

Dessa forma, o presente experimento avaliou o efeito de diferentes concentrações espermáticas sobre a qualidade do sêmen pós-descongelação, incluindo características do movimento espermático, integridade da membrana plasmática e susceptibilidade ao estresse oxidativo sobre lipídios como métodos de avaliação.

2. Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados 05 garanhões, de raças variadas (Árabe, Hannoverano, Mangalarga Marchador, Quarto de Milha e Westfallen), sob regime regular de colheita de sêmen, pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina – “CERBEQ”, vinculado ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, SP.

Colheita dos ejaculados

As colheitas de sêmen foram realizadas em manequim com vagina artificial modelo “Botucatu” (Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil). Foram colhidos 04 ejaculados de cada garanhão (n=20).

Processamento e criopreservação das amostras

Após a colheita, o sêmen foi filtrado para remoção da fração gel e de sujidades, avaliando-se na fração livre de gel a concentração espermática, através de câmara de Neubauer. Os parâmetros de cinética espermática foram avaliados através de um analisador computadorizado dos movimentos espermáticos - CASA (HTM-IVOS 12; Hamilton-Thorne Research, Danvers, MA, USA) depositando uma alíquota de 10 µL de sêmen em uma câmara de Makler (Makler Counting Chamber®, Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) pré-aquecida a 37°C. Em cada amostra avaliou-se no mínimo 500 células e somente os ejaculados com motilidade total igual ou superior a 60% foram utilizados para criopreservação

Para criopreservação dos ejaculados empregou-se a técnica descrita por Papa *et al.* (2002), na qual cada ejaculado foi diluído em meio diluente à base de leite e glicose (Botu-Sêmen®, Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil) em uma proporção de 1:1 (meio:sêmen) e centrifugado a 600xg por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os *pellets* ressuspensos para as concentrações de 100×10^6 , 200×10^6 e 400×10^6 de espermatozóides totais/mL no meio diluente de congelamento Botu-Crio® (Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil). Após envase em palhetas de 0,5 ml e lacrá-las com álcool polivinílico, estas foram distribuídas em uma grade e resfriadas a 5°C por 20 minutos. Decorrido este período, a grade contendo as palhetas foi transferida para uma caixa de isopor de 40 litros e mantida por 20 minutos horizontalmente a uma distância de 6 cm da coluna de nitrogênio líquido (4 cm), sendo em seguida, imersa no nitrogênio.

Descongelamento das amostras e avaliações espermáticas

As palhetas foram descongeladas a 46°C por 20 segundos, de acordo com o proposto por Dell'Aqua Jr. et al. (2002). Para análise de cinética espermática nas amostras de sêmen criopreservado empregou-se a avaliação computadorizada considerando as seguintes variáveis: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e espermatozoides rápidos (RAP, %).

Adicionalmente, foi realizada a análise de integridade da membrana plasmática (IMP, %) empregando-se a técnica de Harrison & Vickers (1990) modificada por Zúccari (1998) utilizando a associação das sondas fluorescentes diacetato de 6-carboxifluoresceína e iodeto de propídio e o teste de resistência das células espermáticas ao estresse oxidativo pelo método de quantificação do malondialdeído (TBARS, $\text{ng}/10^6\text{sptz}$), um subproduto da peroxidação lipídica (NICHI *et al.*, 2007).

Análise estatística

A análise estatística das variáveis estudadas no sêmen congelado/descongelado foi realizada mediante o programa SAS 9.1. Inicialmente, empregou-se o programa GLM para detectar heterocedasticidade por meio do teste de Brown-Forsythe. Em seguida, os dados foram analisados mediante o programa MIXED, o modelo estatístico incluiu o efeito fixo de concentração e os efeitos aleatórios de ganhões, colheitas dentro de ganhão e resíduos. Adotou-se uma estrutura de covariância auto-regressiva de primeira ordem para todas as variáveis, exceto MP, VSL e ALH, para as quais, em virtude da heterocedasticidade detectada, usou-se uma matriz não estruturada de covariâncias. Adotou-se um nível de probabilidade de 0,05 para diferenças estatisticamente significativas.

3. Resultados

Foram observados efeitos significativos ($p < 0,05$) da concentração sobre as variáveis de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), frequência de batimento flagelar (BCF) e espermatozóides rápidos (RAP), denotando superioridade para a criopreservação em concentrações mais baixas. Para a variável de motilidade total verificou-se um efeito logarítmico, sendo que para as demais variáveis nas quais tenham sido detectados efeitos significativos, estes demonstraram um efeito linear (Tabela 1 e Figuras 1-7). Para as demais variáveis (deslocamento lateral de cabeça, ALH; retilinearidade, STR; linearidade, LIM; integridade de membrana plasmática, IMP; resistência espermática ao estresse oxidativo, TBARS) não foi constatado efeito da concentração ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de quadrados mínimos com respectivos erros padrão e equações de regressão das variáveis analisadas pós-descongelamento nas amostras de sêmen equino criopreservadas em diferentes concentrações espermáticas (100×10^6 , 200×10^6 e 400×10^6 de espermatozoides totais/ml).

Variável	Concentração (10^6 spz/mL)			Equação de Regressão	p
	100	200	400		
MT (%)	74,5 (3,14)	71,6 (3,14)	70,6 (3,14)	$105,1+0,0195x-16,2774\log(x)$	0,0331
MP (%)	34,8 (2,58)	33,5 (2,79)	32,0 (2,88)	$35,6768-0,00841x$	0,0163
VAP ($\mu\text{m/s}$)	95,8 (2,56)	94,6 (2,56)	91,85 (2,56)	$97,15-0,01326x$	0,0021
VSL ($\mu\text{m/s}$)	74,8 (1,63)	74,0 (1,66)	71,8 (1,60)	$75,8531-0,01025x$	0,0002
VCL ($\mu\text{m/s}$)	176,4 (4,15)	173,6 (4,15)	167,4 (4,15)	$179,5-0,03038x$	0,0001
ALH (μm)	6,8 (0,10)	6,8 (0,10)	6,6 (0,10)	-	>0,05
BCF (Hz)	31,75 (0,87)	31,40 (0,87)	30,80 (0,87)	$32,05-0,00314x$	0,0473
STR (%)	77,7 (0,61)	77,8 (0,61)	77,7 (0,61)	-	>0,05
LIN (%)	43,4 (0,43)	43,5 (0,43)	43,6 (0,43)	-	>0,05
RAP (%)	59,5 (4,41)	56,4 (4,41)	54,3 (4,41)	$60,525-0,01514x$	0,0045
IMP (%)	41,6 (2,66)	40,1 (2,66)	39,4 (2,66)	-	>0,05
TBARS ($\text{ng}/10^6\text{sptz}$)	40,5 (2,57)	36,5 (2,57)	36,1 (2,57)	-	>0,05

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VAP: velocidade ao longo de uma trajetória média, VSL: velocidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, ALH: deslocamento lateral de cabeça, BCF: frequência de batimento flagelar, STR: retilinearidade, LIN: linearidade, RAP: espermatozoides rápidos, IMP: células com membrana plasmática íntegra, TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

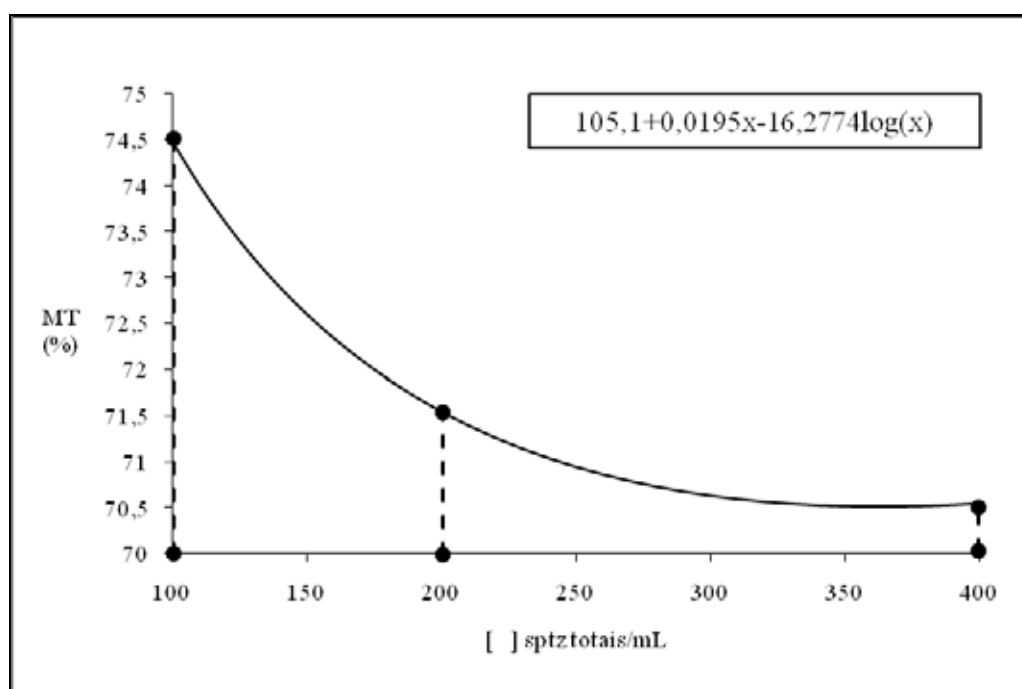


Figura 1. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito logarítmico da concentração na variável motilidade total (MT) no sêmen equino descongelado.

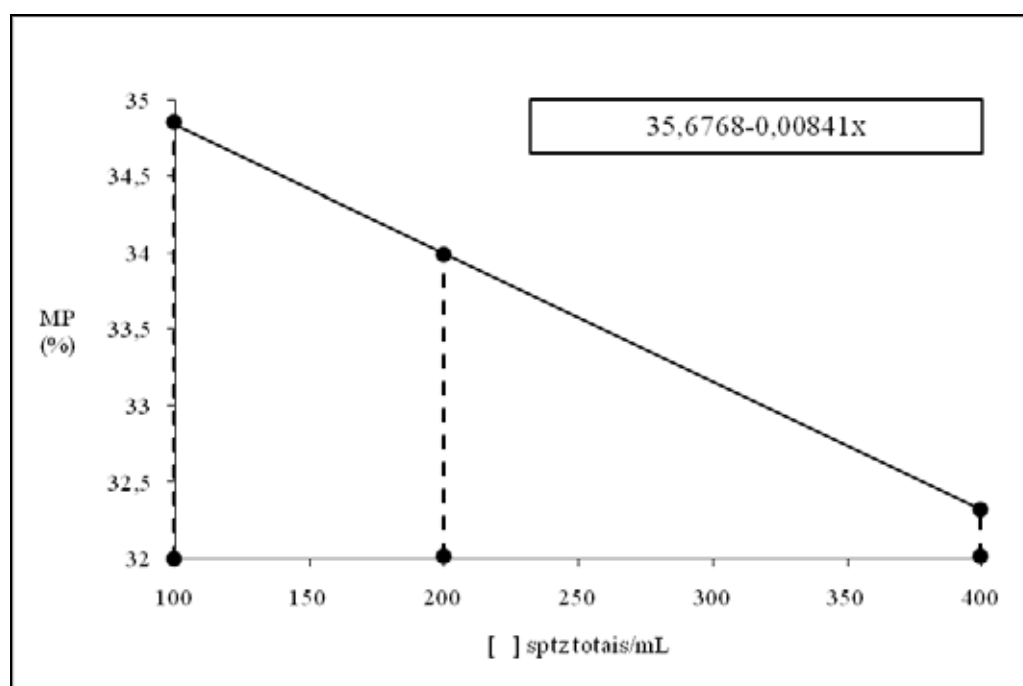


Figura 2. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável motilidade progressiva (MP) no sêmen equino descongelado.

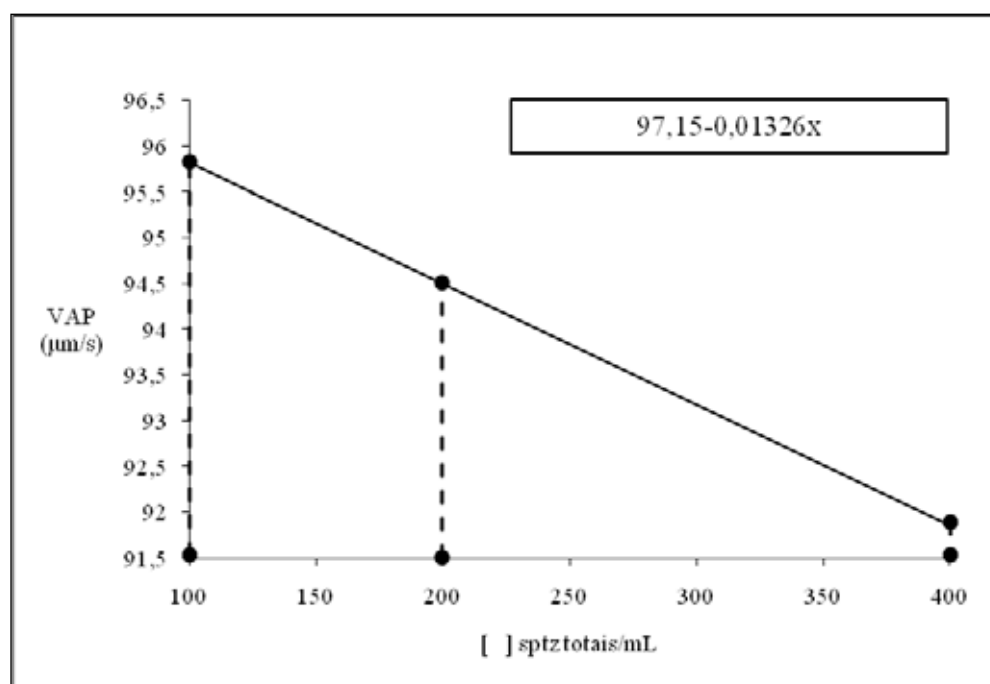


Figura 3. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP) no sêmen equino descongelado.

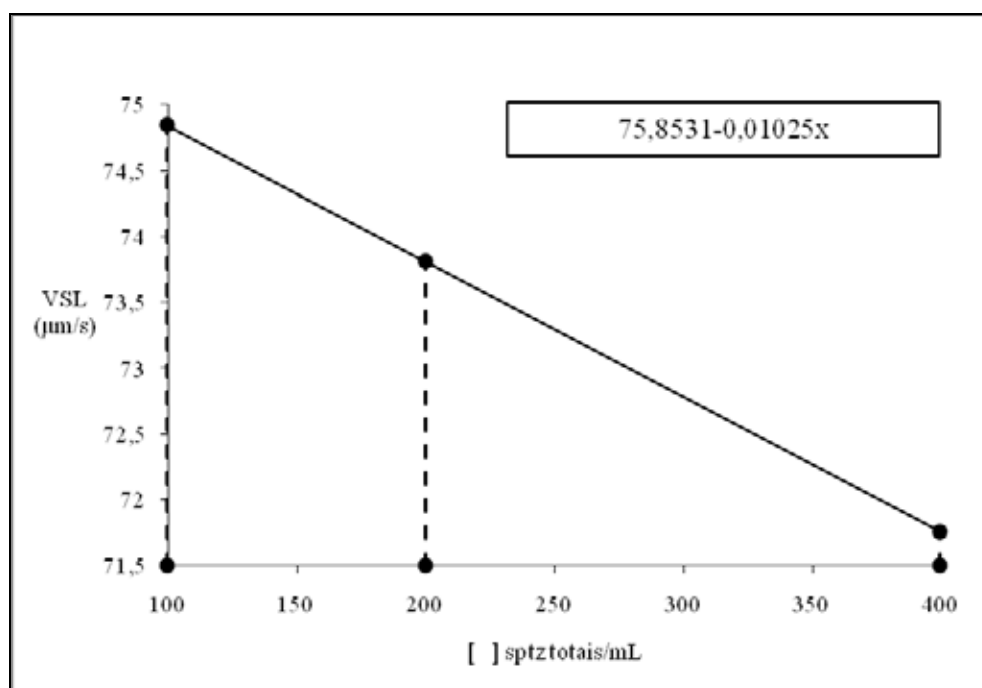


Figura 4. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável velocidade progressiva (VSL) no sêmen equino descongelado.

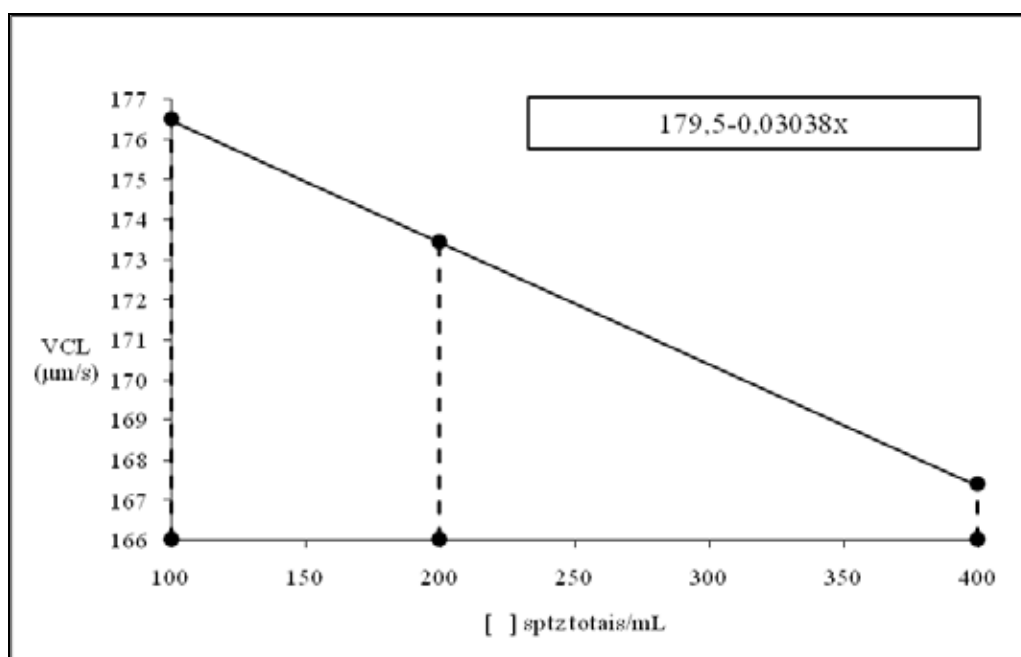


Figura 5. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável velocidade curvilinear (VCL) no sêmen equino descongelado.

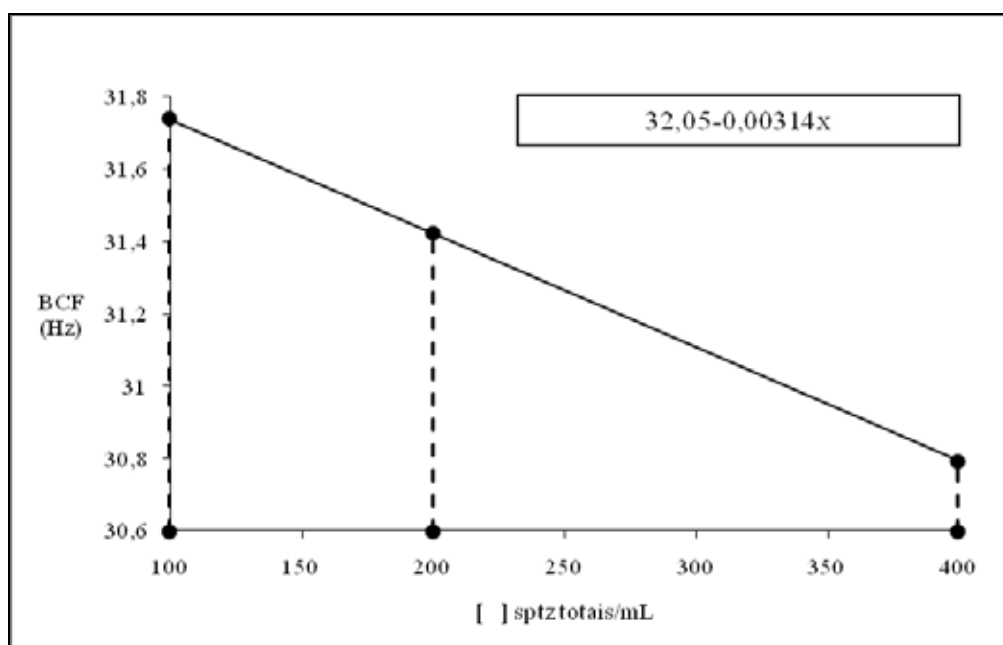


Figura 6. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável frequência de batimento flagelar (BCF) no sêmen equino descongelado.

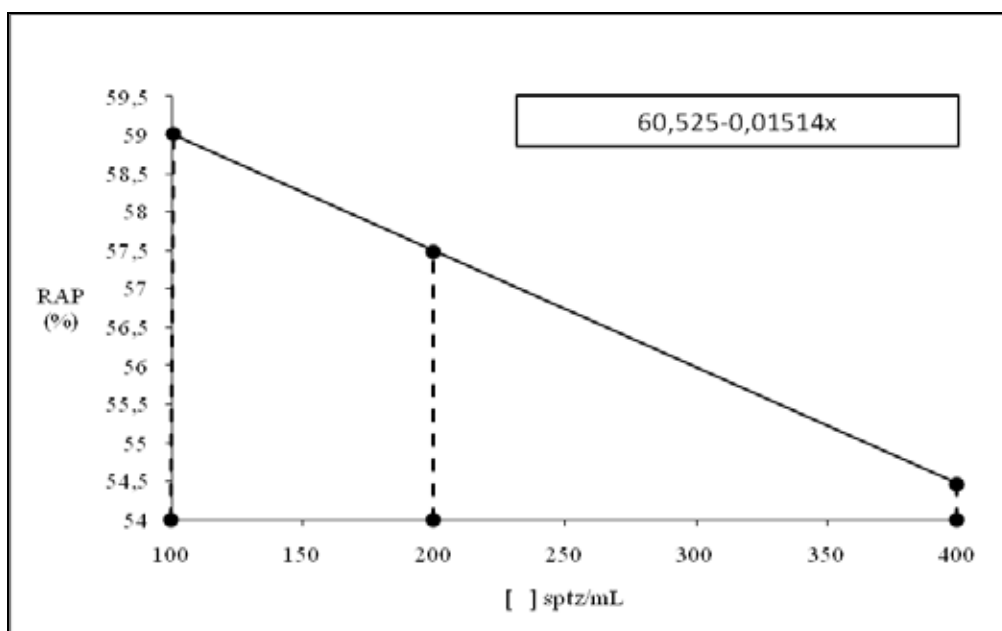


Figura 7. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável espermatozoides rápidos (RAP) no sêmen equino descongelado.

4. Discussão

Neste experimento várias características de cinética espermática foram influenciadas pela concentração espermática, concordando com resultados relatados por outros autores.

Heitland et al. (1996) analisaram o efeito de cinco concentrações (20, 200, 400, 800 e 1600×10^6 de espermatozoides/mL) sob variáveis de cinética espermática, empregando dois meios para criopreservação de sêmen equino. Obteve-se uma superioridade na motilidade total e progressiva para as concentrações entre 20 a 400×10^6 espermatozoides/mL.

Em 1998, Loomis & Clark avaliaram o efeito do envase do sêmen nas concentrações de 200, 400 e 800×10^6 de espermatozoides/mL sobre os parâmetros de motilidade total e progressiva e verificaram que 200×10^6 de espermatozoides/mL foi superior às demais concentrações e 400×10^6 de espermatozoides/mL foi superior a 800×10^6 espermatozoides/mL.

Clulow et al. (2007) demonstraram que amostras de sêmen eqüino criopreservadas a 40×10^6 de espermatozóides/mL foram superiores a 400×10^6 de espermatozóides/mL para as variáveis de motilidade total e progressiva.

Recentemente, no trabalho desenvolvido por Nascimento et al. (2008) novamente verificou-se uma relação entre todas as variáveis de cinética espermática avaliadas (motilidade total, motilidade progressiva, velocidade progressiva, velocidade curvilínea, deslocamento lateral de cabeça e frequência de batimento flagelar) e concentração espermática para amostras de sêmen criopreservado. Observou-se que a concentração de 100×10^6 de espermatozóides/mL foi superior a 200 e 400×10^6 de espermatozóides/mL e que 200×10^6 de espermatozóides/mL foi superior a 400×10^6 de espermatozóides/mL.

No entanto, Papa et al. (1989) não observaram diferenças nos índices de fertilidade entre éguas inseminadas com sêmen criopreservado em macrotubo de 4 mL na concentração de 100×10^6 de espermatozóides/mL e em sistemas de 2 mL (metade de macrotubo) na concentração de 200×10^6 de espermatozóides/mL.

Angola et al. (1992) encontraram resultados de motilidade progressiva superiores ao empregar 800×10^6 de espermatozóides/mL em comparação a 100×10^6 de espermatozóides/mL. Porém, deve-se destacar que neste estudo a motilidade foi avaliada subjetivamente com microscopia de contraste de fase e os próprios autores levantaram a hipótese de erro de avaliação devido à quantidade distinta de células por campo entre os tratamentos.

Arruda et al. (1993) não verificaram diferenças significativas sob a variável de motilidade progressiva ao testar as concentrações de 500 e 1000×10^6 de espermatozóides/mL em palhetas de 0,5 mL.

Já Leipold et al. (1998) obtiveram taxas de prenhez sem diferença significativa entre amostras criopreservadas a 400 ou 1600×10^6 de espermatozóides/mL.

Adicionalmente, Blanes et al. (2005) também não observaram efeito significativo da concentração (100, 200, 300 e 400×10^6 de espermatozoides/mL) sob características de cinética espermática.

A avaliação da integridade da membrana plasmática é um importante parâmetro de qualidade seminal (VARNER, 2008). Porém, os resultados deste estudo, não demonstraram efeito da concentração sobre a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, conforme demonstrado por Blanes et al. (2005). Por outro lado, Nascimento et al. (2008) verificaram também um efeito da concentração sobre a integridade de membrana plasmática.

Acredita-se que divergência de resultados entre os experimentos ocorra em função de variações nos procedimentos adotados para o processamento, criopreservação, descongelação ou avaliação do sêmen, pois como abordado anteriormente, cada laboratório adota uma técnica de eleição. Adicionalmente, há evidências de que o efeito da concentração possui um grau de relação com características individuais dos animais utilizados (BALLESTER *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Outro fator a ser considerado é meio diluente, não apenas pela constituição química e conseqüente interação entre as substâncias e os espermatozoides, como também pelas características físicas que podem influenciar a organização dos cristais de gelo e canais de solução que abrigam os espermatozoides (AMIRAT *et al.*, 2005). Corrobora com esta hipótese o estudo desenvolvido por Heitland et al. (1996), demonstrando haver uma interação entre concentração e meio diluente, pois os resultados relativos ao efeito da concentração variaram em função do meio utilizado.

Um dos objetivos deste experimento foi verificar se maiores concentrações de células poderiam acarretar em menor resistência ao estresse oxidativo devido ao aumento proporcional de células anormais, pois sabe-se que a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é maior na presença de células danificadas pela congelação, não-viáveis ou morfológicamente anormais (BALL *et al.*, 2001). Porém, não verificou-se

efeito da concentração sobre a resistência das células espermáticas ao estresse oxidativo. Este fato pode estar relacionado ao intervalo de concentração estudado, o qual pode ser ter sido insuficiente para evidenciar alguma diferença ou a capacidade antioxidante do meio de congelação utilizado pode ter mascarado o possível efeito deletério de concentrações mais elevadas (KANKOFER *et al.*, 2005).

O mecanismo por trás da alteração na qualidade seminal decorrente da concentração não é bem esclarecido, mas acredita-se que a quantidade de nutrientes e crioprotetor por célula espermática e fatores físicos como velocidade de congelação das células, formação de cristais de gelo e efeito osmótico possam estar envolvidos (SAMPER & MORRIS, 1998; BALLESTER *et al.*, 2007; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Conclui-se com base nos resultados obtidos neste experimento, a existência de uma relação entre concentração e características de cinética espermática no sêmen eqüino congelado. Sabe-se que a reprodução eqüina se depara com uma alta variabilidade no sêmen de garanhões em resistir ao processo de criopreservação, de modo que a aplicação de diferentes procedimentos durante o processo de congelação de sêmen eqüino tem sido adotada para contornar as particularidades observadas entre animais. Dessa forma, a utilização de concentrações reduzidas em conjunto com outros procedimentos como curvas de refrigeração e congelação, tipos de envase, curvas de descongelação e meios diluentes mais eficientes pode incrementar de forma significativa a qualidade seminal de garanhões que resistem de forma insatisfatória ao processo de criopreservação. Adicionalmente, estes resultados trazem boas perspectivas para a criopreservação de sêmen sexado e técnicas de inseminação com baixas doses, pois estas técnicas empregam a criopreservação com concentrações reduzidas.

Referências

AMIRAT, L.; ANTON, M.; TAINURIER, D.; CHATAGNON, G.; BATTUT, I.; COURTENS, J.L. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v. 129, p. 535-543, 2005.

ANGOLA, A.P.; MÉNDEZ, J.V.; QUINTERO, L.Z. Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y La motilidad posdescongelación del semen de equino. **Veterinaria México**, v. 23, p. 315-318, 1992.

ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; TAVEIRA, R.T.; VIEIRA, R.C.; VISINTIN, J.A. Duas técnicas para o congelamento do sêmen de eqüinos acondicionado em palhetas de 0,50 mL. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1993. **Anais...** p. 327.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 508–515, 2001.

BALLESTER, J.; JOHANNISSON, A.; SARAVIA, F.; HAARD, M.; GUSTAFSSON, H.; BAJRAMOVIC, D.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Post-thaw viability of bull AI-doses with low-sperm numbers. **Theriogenology**, v. 68, p. 934-943, 2007.

BLANES, M.S; PAPA, F.O.; DORES, C.B.; MELO, C.M.; CROCCI, A.J. Influência do número de espermatozóides e tempo de estabilização na congelação de sêmen eqüino utilizando-se o diluente Botu-Crio. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 303, 2005.

CLULOW, J.R.; MANSFIELD, L.J.; MORRIS, L.H.A.; EVANS, G.; MAXWELL W.M.C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 298-308, 2008.

DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen, **Animal Reproduction Science**, v. **68**, p. 344-346, 2002.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p.131-147, 1996.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K.; PICKETT, B.W.; HAMILTON, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, p. 47-53, 1996.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. **Theriogenology**, v. 63, p. 1354-1365, 2005.

LEIPOLD, S.D.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; BRINSKO, S.P.; VANDERWALL, D.K. Effect of spermatozoa concentration and number on fertility of frozen equine semen. **Theriogenology**, v. 49, p.1537-1543, 1998.

LOOMIS, P.R.; CLARK, J.S. Motion characteristics of frozen-thawed equine spermatozoa paced in 0.5 mL straws at various concentrations. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. **Proceedings...** p. 142.

LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 191-200, 2001.

LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, p. 480-491, 2005.

LOOMIS, P.R.; GRAHAM, J.K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 119-128, 2008.

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 on Motion Characteristics and Plasma, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes of Equine Cryopreserved Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 351-358, 2008.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I.G.F.; CORTADA, C.N.M.; BARNABE, V.H.; DE CLERCQ, J.B.P.; BOLS, P.E.J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on *in vitro* fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 °C. **Theriogenology**, v. 67, p. 334-340, 2007.

PAPA, F.O.; PRESTES, N.C.; ALVARENGA, M.A.; BICUDO, S.D.; BRANCO, M.D.L. Influência de diferentes volumes sobre os parâmetros espermáticos e sobre os índices de fertilidade de sêmen congelado de eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.1, p. 223, 1989.

PAPA, F.O. et al. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 184-187, 2002.

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. **Biology of Reproduction**, v. 74, p. 359-365, 2006.

SAMPER, J.C.; MORRIS, C.A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**, v. 49, p. 895-903, 1998.

SAMPER, J.C.; HANKINS, K. Breeding mares with frozen semen in private practice. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION

OF EQUINE PRACTITIONERS, 47, 2001, San Diego. **Proceedings...** p. 314-318.

SAMPER, J.C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 219-228, 2001.

VARNER, D.D. Approaches to cryopreservation of equine semen. Current techniques for semen cryopreservation and new investigative strategies that may improve performance of cryopreserved semen from a higher percentage of stallions. In: ANNUAL MEETING OF THE ITALIAN ASSOCIATION OF EQUINE VETERINARIANS, 9, 2003, PISA. **Proceedings...**

VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v.70, p. 448-462, 2008.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998. 121f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

3.2 Artigo II

Avaliação do momento da inseminação sobre a fertilidade do sêmen eqüino congelado

1. Introdução

Desde sua introdução, a utilização da inseminação artificial vêm crescendo constantemente dentro da reprodução de eqüinos, sendo uma técnica amplamente difundida na maioria das raças de cavalos (KATILA, 2005; LOOMIS & GRAHAM, 2008).

Conseqüentemente ao desenvolvimento das técnicas de transporte de sêmen refrigerado, os criadores rapidamente deram-se conta dos benefícios de transportar o sêmen às éguas ao invés de levar as éguas aos garanhões. Mais recentemente, as limitações de logística (tempo, distancia e atrasos no transporte) relacionadas ao sêmen refrigerado associadas aos benefícios adicionais do sêmen congelado têm levado muitos criadores a enxergar a criopreservação como um método prático e eficiente para o transporte ou armazenamento de sêmen (LOOMIS & GRAHAM, 2008). Concomitantemente à aceitação do uso de sêmen congelado por várias associações de raça, houve uma renovação e estímulo nas pesquisas sobre protocolos para congelação de sêmen de garanhões (ALVARENGA *et al.*, 2005).

Sabe-se que a qualidade do sêmen, o “status” reprodutivo das fêmeas, o manejo das éguas durante o estro e a experiência do inseminador são fatores de grande impacto nos resultados de um programa envolvendo a utilização de sêmen congelado (VIDAMENT *et al.*, 1997; SAMPER *et al.*, 2007).

No entanto, na reprodução eqüina, especialmente em algumas raças, a inseminação com sêmen congelado não é bem compreendida, fazendo com que a técnica seja alvo de certo ceticismo. Isto deve-se a fatores como: manejo mais trabalhoso e oneroso das éguas a serem cobertas, maior conhecimento e habilidade técnica para processamento e criopreservação do

sêmen, taxas de prenhez inferiores ao sêmen fresco e refrigerado e ausência de padrões de qualidade na distribuição do sêmen congelado (KATILA, 2005; LOOMIS & GRAHAM, 2008; SAMPER *et al.*, 2007).

Atualmente, tornaram-se rotineiros a adoção de dois métodos para a inseminação com sêmen congelado. Em um dos métodos, as éguas são inseminadas imediatamente antes ou após a ovulação, havendo a necessidade de múltiplas avaliações e um esforço considerável. Com essa prática há a realização de apenas uma cobertura ao cada ciclo, evitando-se o desperdício de sêmen em ciclos com ovulações anormais (SAMPER *et al.*, 2007).

Recentemente, um método simples envolvendo um protocolo de inseminações “programadas” ou em tempo pré-determinado tem sido adotado por alguns profissionais como forma de reduzir o trabalho e os custos decorrentes de inseminações com sêmen congelado. Este protocolo envolve duas inseminações, a primeira a 24 e a segunda a 40 horas, após a administração de um agente indutor de ovulação (hCG ou deslorelina) a uma égua com um folículo pré-ovulatório. Esta técnica necessita que as éguas sejam examinadas apenas uma vez ao dia durante o estro até a ovulação ser confirmada, similar ao manejo de éguas inseminadas com sêmen refrigerado (SQUIRES *et al.*, 2002; SQUIRES *et al.*, 2003; LOOMIS & SQUIRES, 2005; METCALF, 2007; LOOMIS & GRAHAM, 2008). A principal desvantagem desta técnica é o potencial desperdício de sêmen, além de alguns profissionais acreditarem que a resposta inflamatória pós-inseminação pode ser mais severa (SAMPER *et al.*, 2007).

Ao abordar a utilização do sêmen eqüino criopreservado, Loomis & Squires (2005) destacaram a necessidade de estudos controlados para avaliar esquemas de inseminação, já que muitos dos dados e conceitos adotados provêm de informações obtidas de levantamentos clínicos.

Dessa forma, foi realizado um estudo comparativo entre o método de inseminação pós-ovulação ou “convencional” e o método em tempo pré-

determinado ou “programado”, avaliando tanto os resultados de fertilidade como também o acúmulo de líquido intra-uterino pós-cobertura.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais

2.1.1. Garanhões

Foram utilizados 02 garanhões, das raças Westfallen e Mangalarga Marchador, com índices de alta (garanhão A) e baixa fertilidade (garanhão B) no histórico reprodutivo de inseminação com sêmen congelado. Ambos os garanhões são de propriedade do Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina – “CERBEQ”, vinculado ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, SP.

2.1.2. Éguas

Um total de 19 éguas foi utilizado, de forma que para o garanhão A foram utilizadas 15 éguas (30 ciclos) e para o garanhão B 14 éguas (28 ciclos), totalizando 58 ciclos. As éguas pertencem ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina – “CERBEQ”, vinculado ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, SP.

2.2. Colheita dos ejaculados

As colheitas de sêmen foram realizadas em manequim com vagina artificial modelo “Botucatu” (Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil). Foram colhidos e utilizados 06 ejaculados de cada garanhão (n=12).

2.3. Processamento e criopreservação das amostras

Após cada colheita, o sêmen foi filtrado para remoção da fração gel e de sujidades, avaliando-se na fração livre de gel a concentração espermática, através de câmara de Neubauer. Os parâmetros de cinética espermática foram examinados através de um analisador computadorizado

dos movimentos espermáticos - CASA (HTM-IVOS 12; Hamilton-Thorne Research, Danvers, MA, USA) através da deposição de uma alíquota de 10 μL de sêmen em câmara de Makler (Makler Counting Chamber[®], Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) pré-aquecida a 37°C. Em cada amostra avaliou-se no mínimo 500 células e somente os ejaculados com motilidade total igual ou superior a 60% foram utilizados para criopreservação.

Para criopreservação dos ejaculados empregou-se a técnica descrita por Papa et al. (2002), na qual cada ejaculado foi diluído em meio diluente à base de leite e glicose (Botu-Sêmen[®], Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil) em uma proporção de 1:1 (meio:sêmen) e centrifugado a 600xg por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os *pellets* ressuspensos para a concentração de 100×10^6 de espermatozóides totais/mL com o meio de congelação Botu-Crio[®] (Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil). Após o sêmen ser envasado em palhetas de 0,5 ml e lacrá-las com álcool polivinílico, estas foram distribuídas em uma grade e resfriadas a 5°C por 20 minutos em geladeira. Decorrido este período, a grade contendo as palhetas foi transferida para uma caixa de isopor de 40 litros e mantida por 20 minutos horizontalmente a uma distância de 6 cm da coluna de nitrogênio líquido (4 cm), sendo em seguida, imersa no nitrogênio.

2.4. Descongelação das amostras e avaliações espermáticas

As palhetas foram descongeladas a 46°C por 20 segundos, de acordo com o proposto por Dell'Aqua Jr. et al. (2002). Para análise das amostras de sêmen criopreservado empregou-se a avaliação computadorizada de cinética espermática considerando as seguintes variáveis: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e espermatozóides rápidos (RAP, %).

Adicionalmente, foi realizada a análise de integridade da membrana plasmática (IMP, %) empregando-se a técnica de Harrison & Vickers (1990) modificada por Zúccari (1998) utilizando a associação das sondas fluorescentes diacetato de 6-carboxifluoresceína e iodeto de propídio.

2.5. Manejo e inseminação das éguas

As éguas foram examinadas diariamente através de palpação retal e ultra-sonografia para monitoração do ciclo estral através de avaliações da característica uterina e atividade ovariana. Quando um folículo >35 mm e edema uterino foram detectados, administrou-se 1mg de acetato deslorelina por via intramuscular. Após 18 horas de aplicação do agente indutor de ovulação, as éguas foram palpada em intervalos de 6 horas até a detecção da ovulação.

Ao empregar a metodologia de inseminação pós-ovulação, realizou-se uma única inseminação dentro do intervalo de até 6 horas pós-ovulação com 800×10^6 de espermatozoides totais. Para o método de inseminação em tempo pré-determinado, duas inseminações com dose de 400×10^6 de espermatozoides totais cada, foram feitas decorridas 24 e 40 horas pós-indução da ovulação. Em todas as inseminações utilizaram-se pipetas flexíveis (Minitübe®, Minitübe do Brasil Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil) para deposição do sêmen na extremidade do corno uterino ipsilateral ao ovário contendo o folículo pré-ovulatório ou corpo hemorrágico.

A distribuição das éguas entre os garanhões e ordem da metodologia de inseminação empregada seguiu um critério aleatório, sendo que pelo menos dois ciclos de cada égua foram utilizados para cada garanhão. Dessa forma, cada égua serviu como próprio controle ao avaliar cada método de inseminação, pois no ciclo seguinte procedeu-se a inseminação com sêmen do mesmo garanhão e de mesma partida, modificando-se apenas o manejo de inseminação.

Decorridas 24 horas da última inseminação avaliou-se, através de ultrassonografia, a presença de líquido intra-uterino em todo o útero, com especial atenção à região do fundo do corpo uterino, classificando-se como

positivo qualquer evidencia de fluido (traços anecóicos) livre no lúmen uterino.

2.6. Diagnóstico de gestação

Após 14 dias da ovulação realizaram-se os diagnósticos de gestação através de exame ultrassonográfico. As éguas prenhes e vazias receberam 7,5 mg por via intramuscular de dinoprost trometamina para luteólise e retorno a ciclicidade.

2.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada mediante o programa SAS 9.1. Inicialmente, para comparação entre as variáveis seminais pós-descongelação entre os garanhões utilizou-se a análise de variância (ANOVA) através do Proc GLM. Para avaliação dos índices de fertilidade entre os garanhões e metodologias de inseminação, assim como para presença de líquido intra-uterino pós-inseminação, realizou-se análise de regressão logística empregando-se o Proc GENMOD. Adicionalmente, a fim de verificar diferenças quanto ao momento de detecção da ovulação entre cada metodologia de inseminação procedeu-se a análise de variância (ANOVA) através do Proc GLM. Adotou-se um nível de probabilidade de 0,05 para diferenças estatisticamente significativas.

3. Resultados

Todas as características de cinética espermática avaliadas pós descongelação apresentaram diferenças significativas entre os garanhões A e B ($p < 0,05$). No entanto, não foi observada influência do garanhão na variável de integridade de membrana plasmática ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Médias e desvios padrão das características seminais analisadas pós-descongelamento nas amostras de sêmen dos garanhões A e B

	Garanhão A	Garanhão B
MT (%)	77,3±3,40 ^a	70,5±1,38 ^b
MP (%)	42,1±3,18 ^a	27,0±1,41 ^b
VAP (µm/s)	99,1±3,34 ^a	86,2±2,48 ^b
VSL (µm/s)	79,3±3,25 ^a	67,3±1,75 ^b
VCL (µm/s)	181,1±7,34 ^a	165,7±5,32 ^b
ALH (µm)	6,7±0,16 ^a	7,0±0,19 ^b
BCF (Hz)	33,9±1,07 ^a	32,3±1,21 ^b
STR (%)	79,6±1,13 ^a	78,0±0,89 ^b
LIN (%)	44,7±0,49 ^a	41,5±0,84 ^b
RAP (%)	65,3±4,07 ^a	47,0±2,97 ^b
IMP (%)	34,0±3,16	31,7±4,08

^{a, b} Médias com letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$)

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VAP: velocidade ao longo de uma trajetória média, VSL: velocidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, ALH: deslocamento lateral de cabeça, BCF: frequência de batimento flagelar, STR: retilinearidade, LIN: linearidade, RAP: espermatozoides rápidos, IMP: células com membrana plasmática íntegra

Observou-se também um efeito significativo do garanhão sobre as taxas de prenhez, as quais foram de 63,3% (19/30) para o garanhão A e 28,6% (8/28) para o garanhão B ($p < 0,05$). De uma forma geral, não foi observado efeito significativo da metodologia de inseminação sobre as taxas

de prenhez, sendo que esta similaridade foi mantida para os dois garanhões ($p>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Taxas de fertilidade dos garanhões A e B para inseminação pós-ovulação e inseminação 24 e 40 horas pós-indução da ovulação

	Pós-ovulação	24 e 40 horas	Total
Garanhão A	46,7% (7/15)	80,0% (12/15)	63,3% (19/30)
Garanhão B	35,7% (5/14)	21,4% (3/14)	28,6% (8/28)
Total	41,4% (12/29)	51,7% (15/29)	46,6% (27/58)

($p>0,05$)

Pós-ovulação: inseminações realizadas no intervalo de 6 horas pós-ovulação;

24 e 40 horas: inseminações realizadas 24 e 40 horas pós-indução da ovulação

Surpreendentemente, a realização de apenas uma inseminação pós-ovulação resultou em uma porcentagem significativamente maior de acúmulo de líquido intra-uterino em relação ao protocolo com duas inseminações ao realizar a avaliação 24 horas após a última inseminação ($p<0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de acúmulo de líquido intra-uterino nas éguas inseminadas com o método pós-ovulação ou a 24 e 40 horas pós-indução da ovulação

	Pós-ovulação	24 e 40 horas	Total
Fluido uterino	58,6% (17/29) ^a	34,0% (10/29) ^b	46,6% (27/58)

^{a, b}Médias com letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p<0,05$)

Pós-ovulação: inseminações realizadas no intervalo de 6 horas pós-ovulação;

24 e 40 horas: inseminações realizadas 24 e 40 horas pós-indução da ovulação.

O intervalo médio de tempo entre a indução e a ovulação foi de 40,9 horas, não havendo diferença entre os grupos ($p>0,05$) (Tabela 3). Vale ressaltar que em 87,9% dos ciclos (51/58) a ovulação ocorreu entre 30 e 48 horas pós-indução e que em apenas 7,0% dos ciclos (4/58) foi anterior a 24 horas.

Tabela 4. Intervalo médio entre a indução e a ovulação nas éguas inseminadas com o método pós-ovulação ou a 24 e 40 horas pós-indução da ovulação

	Pós-ovulação	24 e 40 horas
Ovulação	41,0 \pm 7,87 h	40,9 \pm 7,06 h

($p>0,05$)

Pós-ovulação: inseminações realizadas no intervalo de 6 horas pós-ovulação;

24 e 40 horas: inseminações realizadas 24 e 40 horas pós-indução da ovulação.

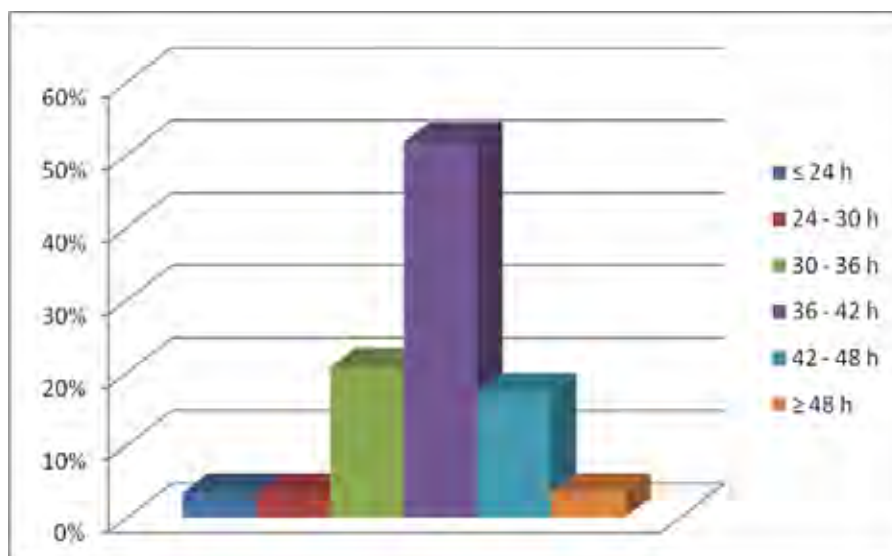


Figura 1. Distribuição do intervalo de detecção da ovulação para os ciclos de inseminação dentro do intervalo de 6 horas pós-ovulação (n=29).

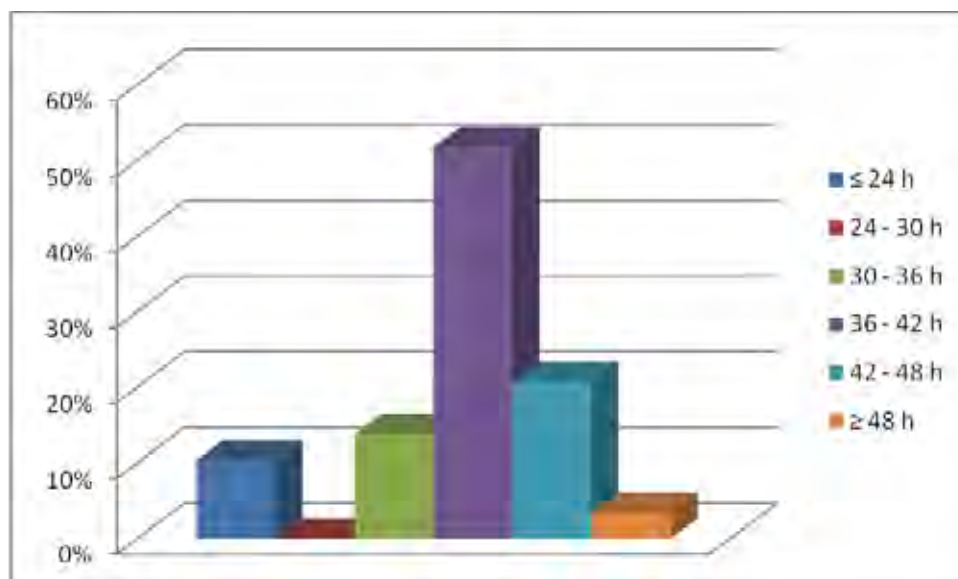


Figura 2. Distribuição do intervalo de detecção da ovulação para os ciclos de inseminação a 24 e 40 horas pós-indução da ovulação (n=29).

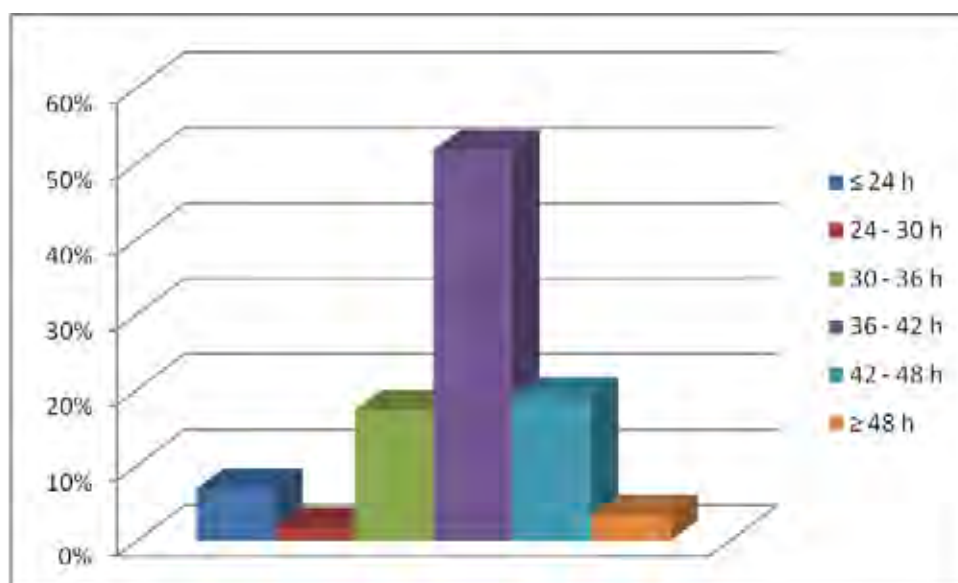


Figura 3. Distribuição do intervalo de detecção da ovulação para todos os ciclos inseminados (n=58).

4. Discussão

De acordo com os dados de cinética espermática e fertilidade, ficou evidente a variabilidade do sêmen dos dois garanhões utilizados em resistir ao processo de congelamento e descongelamento. Além de ser um fato previsto, estes resultados corroboram com Alvarenga et al. (1996) ao demonstrar a

influência do fator racial na resistência espermática à congelação, no qual a raça Mangalarga Marchador demonstra maior susceptibilidade aos efeitos da congelação quando comparada às raças de salto. Samper (2001) afirmou que tal variabilidade é um dos grandes entraves à utilização do sêmen congelado.

Porém, não foram observadas diferenças quanto à avaliação de integridade de membrana plasmática. Isto pode estar relacionado à independência das características espermáticas analisadas *in vitro*. Por outro lado, deve-se levar em consideração que a microscopia de epifluorescência possui uma amostragem de contagem celular reduzida tornando-a menos objetiva quando comparada à citometria de fluxo (VARNER, 2008).

As taxas de prenhez resultantes tanto de inseminações pós-ovulação quanto de inseminações em tempo pré-determinado estão dentro dos resultados descritos por outros autores (VIDAMENT *et al.*, 1999; LOOMIS, 2001; SIEME *et al.*, 2003; BARBACINI *et al.*, 2005).

Da mesma forma, a ausência de diferença entre as metodologias de inseminação está de acordo com os resultados relatados.

Loomis (2001) relatou resultados preliminares nos quais 76,4% das éguas (26/34) tornaram-se prenhes após inseminações empregando o método de inseminações “programadas” com sêmen congelado (24 e 40 horas pós-indução), enquanto que 71,4% (15/21) obtiveram diagnóstico positivo após uma única inseminação dentro de 6 horas pós-ovulação.

Squires et al. (2002) relataram similaridade nas taxas de recuperação embrionária ao utilizar a inseminação “programada” com metade da dose em cada inseminação (400×10^6 de espermatozoides totais, 55%) em comparação a inseminação dentro de 6 horas pós-ovulação com a dose total (800×10^6 de espermatozoides totais, 60%).

Em outro trabalho, Squires et al. (2003) apresentaram dados de um levantamento clínico e novamente não constatarem diferenças entre o método “programado” (86,6%) e o método pós-ovulação (83,3%).

No estudo de Barbacini et al. (2005) demonstrou-se que a inseminação em tempo fixo a 24 e 40 horas pós-indução da ovulação não resultou em decréscimo de fertilidade em relação à inseminação pós-ovulação (46 e 76% versus 47 e 57%, respectivamente). Também verificou-se que ao utilizar a metodologia “programada” não houve alteração dos índices de fertilidade ao empregar uma dose inseminante de 400 ou 800x10⁶ de espermatozóides totais em cada inseminação (60% e 31%, respectivamente).

No entanto, um dos objetivos deste estudo foi verificar a eficiência do método “programado” ao utilizar doses de sêmen de garanhões sabidamente com congelabilidade e taxas de prenhez distintas. Samper (2001) afirmou que nos programas de inseminação artificial com sêmen congelado, é incomum que os inseminadores tenham controle da qualidade do sêmen ao cobrir uma égua. Muitas vezes, a qualidade do sêmen é sub-ótima, sendo o manejo reprodutivo uma das ferramentas para aumentar as chances de prenhez.

A longevidade dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino determina o intervalo máximo entre a inseminação e a ovulação. Quando os espermatozóides entram no útero, eles migram para o oviduto e se ligam ao seu epitélio (DAELS, 2003).

Nas éguas, um reservatório espermático é formado após a cobertura através da interação dos espermatozóides com o epitélio do oviduto na região do ístimo. Os espermatozóides armazenados são liberados de forma gradual para potencialmente participar da fertilização do ovócito. O processo de interação entre os espermatozóides e oviduto promove uma seleção de espermatozóides estrutural e bioquimicamente íntegros (ELLINGTON *et al.*, 1999).

A interação do espermatozóide com o oviduto prolonga a viabilidade e capacidade fertilizante das células espermática (ELLINGTON *et al.*, 1993; THOMAS *et al.*, 1994; DOBRINSKI *et al.*, 1995).

Relata-se que existam diferenças entre garanhões quanto à capacidade dos espermatozóides de formarem um reservatório no oviduto da fêmea, de modo que garanhões considerados sub-férteis possuem menos espermatozóides móveis no oviduto (SCOTT *et al.*, 1995; ELLINGTON *et al.*, 1999).

Além disso, os protocolos de congelação utilizados causam danos sub-letais aos espermatozóides que prejudicam a formação do reservatório, resultando em menor número de células no oviduto e com tempo de sobrevivência reduzido após a inseminação (ELLINGTON *et al.*, 1999). Adicionalmente, acredita-se que os espermatozóides submetidos à criopreservação necessitem de um período maior para atingir o oviduto (SAMPER, 2001). Dobrinski *et al.* (1995) demonstraram que espermatozóides criopreservados possuem uma habilidade reduzida para interagir com o epitélio do oviduto e com a zona pelúcida, destacando-se a variabilidade significativa entre garanhões. Adicionalmente, Ellington *et al.* (1999) trabalhando com sêmen eqüino congelado demonstraram que há diferenças entre garanhões tanto em relação ao número de espermatozóides que se ligam ao oviduto como na longevidade destes no sítio de armazenamento.

Alguns trabalhos com sêmen refrigerado e congelado, relacionaram taxas de concepção ao primeiro ciclo com o número de espermatozóides e a longevidade destes no oviduto (ELLINGTON *et al.*, 1999).

Na reprodução eqüina, há um consenso geral de que éguas a serem inseminadas com sêmen congelado devem ser cobertas o mais próximo possível da ovulação. Assim, imaginávamos que um método com inseminação em tempo pré-determinado poderia não ser eficiente ao utilizar sêmen de garanhões com baixa fertilidade, devido à relação entre fertilidade e longevidade espermática. No entanto, observou-se que não houve diferenças significativas entre os protocolos de inseminação para ambos os garanhões utilizados.

Atualmente, não há um padrão quanto ao número de inseminações a serem realizadas em um ciclo ou se esta deve ser feita pré ou pós-ovulação (SAMPER & HANKINS, 2001).

Contudo, Vidament et al. (1997) e (1999) obtiveram taxas de prenhez mais altas ao realizar múltiplas inseminações com sêmen congelado comparadas a uma única inseminação.

Por outro lado, Squires et al. (2002) e (2003) não obtiveram efeito significativo de duas inseminações em comparação a apenas uma.

No trabalho desenvolvido por Sieme et al. (2003), concluiu-se que o efeito benéfico da várias inseminações estaria relacionado à maior probabilidade da inseminação ocorrer próxima à ovulação, ou seja, o intervalo entre a inseminação e a ovulação seria realmente o fator a ser levado em consideração.

Por fim, Loomis & Squires (2005) demonstraram em um grande levantamento de dados de campo que a frequência de inseminação não possui efeito sobre as taxas de prenhez obtidas.

Metcalf (2005) obteve taxas de prenhez similares entre uma ou duas inseminações no ciclo, porém verificou a influência do momento da inseminação em relação à ovulação. Neste estudo, as taxas de prenhez foram maiores para as éguas inseminadas pré-ovulação em relação às cobertas pós-ovulação.

A influência do momento da inseminação em relação à ovulação é também um assunto bastante discutível e sem um consenso geral.

Barbacini et al. (1999) não observaram diferença entre inseminações realizadas 6 horas pré ou pós-ovulação.

Concordando com os achados de Barbacini, na revisão descrita por Loomis & Squires (2005) não se verificou efeito do momento da inseminação sobre as taxas de prenhez.

Porém Samper & Hankins (2001) descreveram que inseminações pré ou pré e pós-ovulação resultariam em maiores taxas de prenhez do que inseminações pós-ovulação, concordando com os resultados de Metcalf (2005).

Metcalf (2007) acredita que a disparidade nas taxas de prenhez entre inseminações pré ou pré e pós-ovulação e inseminações pós-ovulação reflitam a variabilidade na fertilidade dos garanhões (METCALF, 2007).

Deve-se destaca que alguns estudos demonstraram haver maior morte embrionária para éguas inseminadas pós-ovulação (WOODS *et al.*, 1990; KOSKINEN *et al.*, 1990).

Neste sentido, recentemente Cuervo-Arango et al. (2009) demonstraram que o momento da inseminação pode influenciar o transporte espermático ou trânsito embrionário no oviduto, influenciando a diferença de tamanho entre embriões concebidos com inseminações pré ou pós-ovulação.

A idéia que direciona o esquema de inseminação em 24 e 40 horas pós-indução se baseia na idéia de cobrir um intervalo entre 18 a 52 horas pós-indução, garantindo que hajam espermatozóides no trato reprodutivo feminino 12 horas antes ou 6 horas após a ovulação (LOOMIS & SQUIRES, 2005).

No entanto, a ausência de diferença entre os grupos quanto ao intervalo compreendido entre a indução e ovulação e o fato da maioria das ovulações terem ocorrido entre 30 e 48 horas pós-indução da ovulação, levanta a questão da necessidade de uma inseminação logo a 24 horas pós-indução.

No estudo retrospectivo conduzido por Barbacini et al. (2000) observou-se que as ovulações se distribuíram em uma faixa de menos de 12 horas a mais de 48 horas após a indução com hCG, com 75% das éguas ovulando entre 24 e 48 horas após o tratamento.

Porém, Samper (1997) demonstrou que a observação do edema endometrial como critério para a indução da ovulação em conjunto com o tamanho folicular de 35 mm pode controlar de forma mais adequada o intervalo entre indução e ovulação (36-42 horas), com mais de 95% dos ciclos respondendo à indução com hCG.

Neste estudo, adotou-se um critério semelhante ao descrito por Samper (1997), o que justifica a concentração das ovulações. Talvez a primeira inseminação ou uma única inseminação com 36 horas pós-indução poderia ser mais conveniente.

Assim, no trabalho abordando a utilização da inseminação histeroscópica com baixas dose de sêmen congelado, Morris et al. (2003), obtiveram taxas de prenhez de 67% com inseminações em tempo pré-determinado realizadas após 32 horas da indução.

Sieme et al. (2004) obtiveram taxas de prenhez na faixa de 43 a 46% com sêmen congelado utilizando várias técnicas de inseminação após 30 horas da indução da ovulação.

Sieme et al. (2003) demonstraram que o período considerado ótimo para inseminação com sêmen congelado compreende a faixa de 12 horas antes a 12 após a ovulação. Contudo, a maior parte dos autores recomenda que a inseminação seja feita entre 12 horas antes e 4-8 horas após a ovulação (LOOMIS, 2001; SAMPER & HANKINS, 2001).

Nas éguas, a endometrite persistente pós-cobertura, o acúmulo de fluido ou o aumento no edema uterino podem reduzir drasticamente as chances de prenhez (TROEDSSON *et al.*, 1995).

Kotilainen et al. (1994) afirmaram que o sêmen criopreservado não induz a uma reação inflamatória mais severa do que o sêmen fresco, porém, devido ao volume reduzido e a alta concentração espermática, a resposta inflamatória tende a ter maior magnitude do que com outros tipos de sêmen.

Frequentemente, alguns protocolos de inseminação com sêmen congelado incluem uma segunda dose 6-24 horas após a primeira inseminação. No entanto, os resultados são satisfatórios embora ainda estejam presentes no útero neutrófilos provenientes da primeira inseminação. É possível que a pequena quantidade de plasma seminal, <5% remanescente após a centrifugação e remoção do sobrenadante, seja o suficiente para a proteção espermática (KATILA, 2005).

No trabalho conduzido por Metcalf (2000), demonstrou-se que a realização de duas inseminações com intervalo de 6 a 10 horas resultou em taxas de prenhez semelhantes provenientes de cada inseminação, concluindo que a segunda dose de sêmen contribuiu para a fertilização apesar da reação inflamatória produzida pela primeira inseminação.

Surpreendentemente, neste trabalho o protocolo envolvendo duas inseminações em tempo fixo resultou em menor porcentagem de acúmulo de fluido intra-uterino após 24 horas da última inseminação.

Card et al. (2004) demonstraram que duas inseminações subseqüentes com sêmen congelado não induziram a uma inflamação mais acentuada do que uma inseminação, pois o número de neutrófilos após 24 horas da última inseminação não diferiu entre os grupos.

Nos estudos desenvolvidos por Squires et al. (2002) e (2003) observou-se que a incidência de acúmulo de fluido intra-uterino após 24 não diferiu entre uma inseminação pós-ovulação e duas inseminações em tempo fixo.

No levantamento realizado por Loomis & Squires (2005) ficou evidente que o acúmulo de fluido uterino pós-cobertura diminuiu as taxas de prenhez em éguas inseminadas com sêmen congelado, porém a incidência não diferiu entre éguas inseminadas uma ou múltiplas (geralmente duas) vezes no ciclo.

Talvez a utilização de uma concentração reduzida (100×10^6 de espermatozoides/mL) possa ter contribuído para um acúmulo de fluido

prolongado ao realizar apenas uma inseminação pós-ovulação. Katila (2005) propôs que inseminações com concentrações reduzidas podem provocar uma reação inflamatória pós-cobertura menos intensa e mais duradoura. Assim, a utilização de uma concentração reduzida associada a uma única inseminação pós-ovulação, momento no qual algumas éguas já possam estar com a cérvix menos relaxada, podem conjuntamente ter resultado na diferença observada entre os grupos.

Além disso, pelos resultados observados em outros estudos e pelo grupo experimental reduzido, pode ser que ao aumentar o número de observações esta diferença não esteja mais evidente.

A incidência de acúmulo de fluido intra-uterino neste estudo foi mais alta do que o relatado por Barbacini et al (2003). Porém, seguindo o proposto por Loomis & Squires, considerou-se positivo para a presença de fluido mesmo quando pequenas quantidades (traços) foram detectadas, diferentemente do utilizado por Barbacini et al. (2003) os quais registraram a presença de fluido apenas quando a coleção de líquido estivesse medindo, no mínimo, 20 mm.

Neste estudo, ficou claro que a utilização de um esquema simplificado para inseminação com sêmen congelado foi eficiente. Assim, a decisão de examinar as éguas freqüentemente e inseminá-las logo após a ovulação ou adotar um protocolo que permita maior praticidade e menos trabalho dependerá da avaliação entre custo e disponibilidade de doses de sêmen versus despesas com serviços veterinários. Os dados apresentados suportam a idéia de um esquema menos trabalhoso sem prejuízo para os resultados esperados, tornando a inseminação com sêmen criopreservado um procedimento menos desgastante e mais acessível, contribuindo para o crescimento e difusão desta biotecnologia.

Referências

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JR, J. The effect of breeds spermatoc parameters over equine semen freezability. In: Symposium on Stallion Semen, 1996, Amersfoort. **Proceedings...** p. 82.

ALVARENGA, M.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 105-113, 2005.

BARBACINI, S.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; ZAVAGLIA, G. Incidence of embryonic loss in mares inseminated before or after ovulation. **Equine Veterinary Education**, v. 1, p. 108-112, 1999.

BARBACINI, S.; ZAVAGLIA, G.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; NECCHI, D. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination programme using frozen semen. **Equine Veterinary Education**, v. 2, p. 404-408, 2000.

BARBACINI, S.; NECCHI, D.; ZAVAGLIA, G.; SQUIRES, E.L. Retrospective study of the incidence of post-insemination uterine fluid in mares inseminated with frozen-thawed semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 23, p. 493-496, 2003.

BARBACINI, S.; LOOMIS, P.; SQUIRES, E.L. The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen-thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 203-205, 2005.

CARD, C.; CARLEY, S.; GREEN, J.; CHIRINO-TREJO, M. Endometrial cytology in mares bred with frozen semen. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 50, 2004. **Proceedings...**

CUERVO-ARANGO, J.; AGUILAR, J.; NEWCOMBE, J.R. Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound. **Theriogenology**, v. 71, p. 1267-1275, 2009.

DAELS, P.F. New technics of artificial insemination in the mare. 20 de Studiedag van de/21ème Journée d'étude de la Belgian Equine Practitioners Society – BEPS, 2003. **Proceedings...**

DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen, **Animal Reproduction Science**, v. **68**, p. 344-346, 2002.

DOBRINSKI, I.; THOMAS, P.G.A.; BALL, B.A. Cryopreservation reduces the ability of equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cells and zonae pellucidae *in vitro*. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 536-542, 1995.

ELLINGTON, J.E.; BALL, B.A.; BLUE, B.J.; WILKER, C.E. Capacitation-like membrane changes and prolonged viability *in vitro* of equine spermatozoa cultured with uterine tube epithelial cells. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, p. 1505-1510, 1993.

ELLINGTON, J.E.; SAMPER, J.C.; JONES, A.E. OLIVER, S.A.; BURNETT, K.M.; WRIGHT, R.W. *In vitro* interactions of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 51-65, 1999.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

KATILA, T. Effect of the inseminate and site of insemination on the uterus and pregnancy rates of mares. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 31-38, 2005.

KOSKINEN, E.; LINDEBERG, H.; KUNTSI, H.; RUOTSALAINEN, L.; KATILA, T. Fertility of mares after postovulatory insemination. **Journal of Veterinary Medicine Association**, v. 37, p. 77-80, 1990.

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leucocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v. 41, p. 629-636, 1994.

LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 191-200, 2001.

LOOMIS, P.R; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, p. 480-491, 2005.

LOOMIS, P.R.; GRAHAM, J.K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 119-128, 2008.

METCALF, E.S. The effect of postinsemination endometritis on fertility of frozen stallion semen. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 46, 2000, Phoenix. **Proceedings...** p. 330-331.

METCALF, E.S. Optimizing pregnancy rates using frozen-thawed equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 297-299, 2005.

METCALF, E.S. The efficient use of equine cryopreserved semen. **Theriogenology**, v. 68, p. 423-428, 2007.

MORRIS, L.H.; TIPLADY, C.; ALLEN, W.R. Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa onto the uterotubal junction. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p. 197-201, 2003.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 184-187, 2002.

SAMPER, J.C. Ultrasonographic appearance and the pattern of uterine edema to time ovulation in mares. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 43, 1997, Phoenix. **Proceedings...** p. 41-43.

SAMPER, J.C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 219-228, 2001.

SAMPER, J.C.; HANKINS, K. Breeding mares with frozen semen in private practice. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION

OF EQUINE PRACTITIONERS, 47, 2001, San Diego. **Proceedings...** p. 314-318.

SAMPER, J.C.; ESTRADA, A.J.; MCKINNON, A.O. Insemination with frozen semen. In: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. 1. St. Louis: Saunders. 2007. 45, p. 285-288.

SCOTT, M.A.; LIU, I.K.; OVERSTREET, J.W. Sperm transport to the oviducts: abnormalities and their clinical implications. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 41, 1995, New Orleans. **Proceedings...** p. 1-2.

SIEME, H.; SCHÄFER, T.; STOUT, T.A.E.; KLUG, E.; WABERSKI, D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 1153-1164, 2003.

SIEME, H.; BONK, A.; HAMANN, H.; KLUG, E.; KATILA, T. Effects of different artificial insemination techniques and sperm doses on fertility of normal mares and mares with abnormal reproductive history. **Theriogenology**, v. 62, p. 915-928, 2004.

SQUIRES, E.L.; REGER, H.P.; MACLELLAN, L.J.; BRUEMMER, J.E. Effect of time of insemination and site of insemination on pregnancy rates with frozen semen. **Theriogenology**, v. 58, p. 655-658, 2002.

SQUIRES, E.L.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; REGER, H.P.; BRUEMMER, J.E. Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 49, 2003, New Orleans. **Proceedings...** p. 314-318.

THOMAS, P.G.A.; BALL, B.A.; MILLER, P.G.; BRINSKO, S.P. SOUTHWOOD, L. A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 303-309, 1994.

TROEDSSON, M.H.T.; STEIGER, B.N.; IBRAHIM, N.M.; FOSTER, D.N.; CRABO, B.G. Mechanism of sperm-induced endometritis in the mare. **Biology of Reproduction Supplement**, v. 52, p. 307, 1995.

VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v.70, p. 448-462, 2008.

VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen freezability and fertility results. **Theriogenology**, v. 48, p.907-917, 1997.

VIDAMENT, N.; MIGISTRINI, M.; PALMER, E.; CLEMENT, F. Equine artificial insemination in French National Studs. **Reproduction in Domestic Animals Supplement**, v. 6, p. 61-66, 1999.

WOODS, J.; BERGFELD, D.R.; GINTHER, O.J. Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic –loss rate in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, p. 410-415, 1990.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998. 121f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

4. Discussão e conclusões gerais

Os resultados obtidos nos experimentos desenvolvidos neste trabalho encontram embasamento em várias publicações.

Ao abordar a concentração espermática durante a criopreservação, diversos trabalhos demonstraram haver uma relação entre concentração e cinética espermática pós-descongelção (HEITLAND *et al.*, 1996; LOOMIS & CLARK, 1998; CLULOW *et al.*, 2008; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Por outro lado, a superioridade observada para variáveis de cinética espermática não se repetiu para as variáveis de integridade de membrana plasmática e resistência à peroxidação lipídica.

Dessa forma, há a possibilidade de que a utilização de concentrações reduzidas não alcance o efeito biológico esperado. A favor dessa hipótese, estão os resultados obtidos por Papa *et al.* (1989), Angola *et al.* (1992), Arruda *et al.* (1993), Leipold *et al.* (1998) e Blanes *et al.* (2005).

No entanto, em vista da alta variabilidade observada no sêmen de garanhões em resistir ao processo de criopreservação, a utilização de baixas concentrações espermáticas pode ser um procedimento benéfico para o incremento da qualidade seminal de garanhões que respondem de forma insatisfatória.

Quanto aos protocolos de inseminação avaliados, verificou-se que a realização de inseminações em momentos pré-determinados e conseqüentemente mais convenientes para a rotina de um técnico foram tão eficazes quanto o emprego de um manejo intensivo para cobertura dentro de um curto período de tempo pós-ovulação.

Loomis (2001), Squires *et al.* (2002) e (2003) e Barbacini *et al.* (2005) já haviam demonstrando a eficiência deste protocolo.

Porém, além da escassez de dados provenientes de estudos controlados, os estudos anteriores não forneciam maiores detalhes sobre a qualidade seminal empregada. Neste trabalho ficou claro que mesmo ao

utilizar animais com baixos índices de concepção, o protocolo de inseminação “programada” obteve desempenho comparável à inseminação pós-ovulação.

Dessa forma, o critério para adoção de um dos protocolos dependerá do custo e disponibilidade de doses de sêmen em relação a despesas com serviços veterinários.

Assim, conclui-se que a concentração espermática influencia a qualidade seminal pós-descongelação, porém a contribuição biológica deste efeito, dentro dos valores utilizados neste experimento deve ser investigada, já que os efeitos observados ficaram restritos à variáveis de cinética espermática. Com relação a metodologia de inseminação, ficou claro que a utilização de um esquema simplificado e flexível permite a obtenção dos mesmos índices de fertilidade obtidos em manejos intensivos e trabalhosos.

Referências

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction Fertility Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.

ALVARENGA, M.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 105-113, 2005.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JUNIOR, J. The effect of breed and spermatoc parameters over equine semen freezability. In: SYMPOSIUM ON STALLION SEMEN, 1996, Amersfoort. **Proceedings...**

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**. 2002. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v. 10, p. 89-98, 1989.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. 1 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap. 80, p. 715-745.

ANGOLA, A.P.; MÉNDEZ, J.V.; QUINTERO, L.Z. Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y la motilidad posdescongelación del semen de equino. **Veterinaria México**, v. 23, p. 315-318, 1992.

ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; TAVEIRA, R.T.; VIEIRA, R.C.; VISINTIN, J.A. Duas técnicas para o congelamento do sêmen de eqüinos

acondicionado em palhetas de 0,50 mL. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1993. **Anais...** p. 397.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 65-75, 2005.

BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 1007, p. 257-267, 2008.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 508-515, 2001.

BARBACINI, S.; LOOMIS, P.; SQUIRES, E.L. The effect of sperm number and frequency of insemination on pregnancy rates of mares inseminated with frozen-thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 203-205, 2005.

BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 21, p. 47-51, 1957.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 895-902, 2000.

BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.60, 1239-1247, 2003.

BLANES, M.S.; PAPA, F.O.; DORES, C.B.; MELO, C.M.; CROCCI, A.J. Influência do número de espermatozoides e tempo de estabilização na congelação de sêmen eqüino utilizando-se o diluente Botu-Crio. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 303, 2005.

BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v. 67, p. 580-589, 2007.

CEPEA-CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo no Brasil**. Piracicaba : Esalq/USP, 2006, 68p.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

CLULOW, J.R.; MANSFIELD, L.J.; MORRIS, L.H.A.; EVANS, G.; MAXWELL W.M.C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 108, p. 298-308, 2008.

COTTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen eqüino (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, p. 14-25, 2002.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 368-378, 1992.

DE VITA, B. **Estudo de diferentes sistemas e curvas de congelação na eficiência da congelabilidade e fertilidade de sêmen eqüino**. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

FERREIRA, J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelação do sêmen eqüino**. 2000. Tese (Doutorado) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p.131-147, 1996.

GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v. 64. P. 492-502, 2005.

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

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-38, 1992.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K.; PICKETT, B.W.; HAMILTON, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, p. 47-53, 1996.

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

JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, p. 1241-1252, 1992.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 1217-1227, 1997.

KATILA, T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, p. 199-217, 2001.

KEITH, S.L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**. 1998. 104f. Tese – Colorado State University, Fort Collins.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, p. 1-10, 1998.

LEIPOLD, S.D.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; BRINSKO, S.P.; VANDERWALL, D.K. Effect of spermatozoa concentration and number on fertility of frozen equine semen. **Theriogenology**, v. 49, p.1537-1543, 1998.

LOOMIS, P.R.; CLARK, J.S. Motion characteristics of frozen-thawed equine spermatozoa paced in 0.5 mL straws at various concentrations. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. **Proceedings...** p. 142.

LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 191-200, 2001.

LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v. 64, p. 480-491, 2005.

LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 22, p.663-676, 2006.

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

MEDEIROS, A.S.L. **Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotectores para espermatozoides de garanhões**. 2003. 96f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

MEDEIROS, A.S.L.; FERREIRA, H.N.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Índices de fertilidade de espermatozóides de garanhões submetidos ao estresse osmótico por diferentes crioprotetores. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 1006, 2007.

MELO, C.M. **Efeito do armazenamento por 24 horas em diferentes sistemas de refrigeração sobre a viabilidade e fertilidade de sêmen congelado eqüino**. 2005. 101f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

NASCIMENTO, J. **Efeito da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides eqüinos criopreservados**. 2006. 107f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.

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 on Motion Characteristics and Plasma, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes of Equine Cryopreserved Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 351-358, 2008.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B.M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction Developments**, v. 72, p. 230-238, 2005.

OEHNINGER, S.; DURU, N.K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and atrategies to improve outcome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, p. 3-10, 2000.

PAPA, F.O.; PRESTES, N.C.; ALVARENGA, M.A.; BICUDO, S.D.; BRANCO, M.D.L. Influência de diferentes volumes sobre os parâmetros espermáticos e sobre os índices de fertilidade de sêmen congelado de eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n.1, p. 223, 1989.

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

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255-266, 1992.

ROSSI, T.C.; PAPA, F.O.; SANTOS, T.B.; MACEDO, L.P.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; DELL'AQUA JR, J.A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelação de sêmen eqüino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p. 350-352, 2003.

SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C.; CRABO, B.G. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.44, p. 107-114, 1991.

SAMPER, J.C.; HANKINS, K. Breeding mares with frozen semen in private practice. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 47, 2001, San Diego. **Proceedings...** p. 314-318.

SIEME, H.; SCHÄFER, T.; STOUT, T.A.E.; KLUG, E.; WABERSKI, D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**, v. 60, p. 1153-1164, 2003.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. **Cooled and frozen stallion semen**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Bulletin n. 9, 1999.

SQUIRES, E.L.; REGER, H.P.; MACLELLAN, L.J.; BRUEMMER, J.E. Effect of time of insemination and site of insemination on pregnancy rates with frozen semen. **Theriogenology**, v. 58, p. 655-658, 2002.

SQUIRES, E.L.; BARBACINI, S.; NECCHI, D.; REGER, H.P.; BRUEMMER, J.E. Simplified strategy for insemination of mares with frozen semen. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 49, 2003, New Orleans. **Proceedings...** p. 314-318.

SAUBER, K.; BALL, B.A. Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 701-706, 2006.

SAUBER, K.; BALL, B.A. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. **Reproduction**, v. 134, p. 263-270, 2007.

THIELE, J.J.; FRIESLEBEN, H.J.; FUCHS, J.; OCHSENDORF, F.R. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, v. 10, p. 110-115, 1995.

VARNER, D.D. Approaches to cryopreservation of equine semen. Current techniques for semen cryopreservation and new investigative strategies that may improve performance of cryopreserved semen from a higher percentage of stallions. In: ANNUAL MEETING OF THE ITALIAN ASSOCIATION OF EQUINE VETERINARIANS, 9, 2003, PISA. **Proceedings...**

VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology**, v.70, p. 448-462, 2008.

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

ZABLUDOVSKY, N. et al. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. **Andrologia**, v. 31, p. 91-98, 1999.

Anexo

Ajuste do HTMA – IVOS 12 para análise seminal em eqüinos

Características	Ajuste
Número de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células imóveis	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	80%
Referência para velocidade média (VAP)	<70 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VAP)	<30 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VSL)	<20 $\mu\text{m/s}$
Limite inferior de tamanho	0,62 pixels
Limite superior de tamanho	2,98 pixels
Limite inferior de intensidade	0,24
Limite superior de intensidade	1,19
Limite inferior de alongamento	0%
Limite superior de alongamento	100%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95