

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DE DIFERENTES SISTEMAS E CURVAS DE
CONGELAÇÃO NA EFICIÊNCIA DA CONGELABILIDADE
E FERTILIDADE DE SÊMEN EQÜINO

BRUNA DE VITA

Botucatu-SP

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO DE DIFERENTES SISTEMAS E CURVAS DE CONGELAÇÃO NA EFICIÊNCIA DA CONGELABILIDADE E FERTILIDADE DE SÊMEN EQÜINO

BRUNA DE VITA

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

Orientador: Prof.Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu-SP

2008

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*

De Vita, Bruna.

Estudo de diferentes sistemas e curvas de congelação na eficiência da congelabilidade e fertilidade de sêmen eqüino / Bruna de Vita. – Botucatu : [s.n.], 2008

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino - Reprodução 2. Inseminação artificial 3. Sêmen - Crio preservação

CDD 636.10824

Palavras-chave: Eqüino; Congelação; Curvas; Sêmen

Nome do Autor: Bruna De Vita

Título: ESTUDO DE DIFERENTES SISTEMAS E CURVAS DE CONGELAÇÃO
NA EFICIÊNCIA DA CONGELABILIDADE E FERTILIDADE DE SÊMEN
EQÜINO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof.Dr. Marco Antonio Alvarenga

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ-UNESP-Botucatu

Prof^a.Dr^a. Denise Pereira Leme

Membro

Departamento de Reprodução Animal

Fundação de Ensino Superior de Bragança Paulista

Data da Defesa: 07 de abril de 2008

Dedico este trabalho aos meus irmãos Camila e Gustavo, que buscando a felicidade em outro continente me ensinaram a correr atrás dos meus sonhos, sendo sempre presentes apesar da distância. Amo vocês.

Agradecimentos

À Deus, por tudo.

Aos meus pais por todo amor, pela vida e educação que me proporcionaram, pelo exemplo de caráter e honestidade. Tenho muito orgulho de vocês.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa, pela oportunidade, pelos ensinamentos desde o período do Programa de Residência, pelo exemplo de profissionalismo e competência e pelas críticas construtivas que abriram meus olhos.

Ao CNPq pela bolsa de estudos cedida para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Marco Alvarenga por todo conhecimento e por ter gentilmente cedido um dos equipamentos necessários para a realização deste experimento.

À querida Cely, por toda amizade, companheirismo, pelo exemplo de competência e dedicação, além de todo auxílio prestado.

Aos meus queridos amigos e colegas de pós-graduação, Gabriel F. Barcelos Zé Dell'Aqua e Márcio T. do Carmo, pela colaboração direta nos experimentos, e por terem tornado os dias de trabalho mais divertidos.

À amiga Bió, pelo carinho, apoio, conselhos, conversas e todo auxílio prestado.

À Prof. Adj. Maria Denise Lopes, pelos ensinamentos, amizade e conselhos bem humorados.

Aos Professores João e Nereu pela amizade e carinho por mim dispensados.

Aos Docentes do Departamento de Reprodução Animal: Fernanda, Eunice, Meira, Sony minha admiração e agradecimento pelos ensinamentos e atenção prestados.

Aos funcionários Cristina, Miguel, Edílson, Márcio, Tico *“in memorian”*, Walter e Dona Raquel por serem sempre atenciosos e solícitos.

À minha querida amiga Guta, com quem além de dividir as contas, compartilho minha vida. Obrigada por estar ao meu lado sempre, pela paciência, por fazer mais fáceis os momentos difíceis e mais alegres ainda os momentos felizes!

À Ieda, minha querida amiga comprida, por tudo que passamos juntas desde a Residência. Todas as risadas, choros, festas, domingos... Obrigada por fazer parte da minha vida.

Às amigas Bethania, Liani, Vivi e Jeanne obrigada pelo companheirismo, amizade e por tornar minha vida mais alegre com a presença de vocês!

Às amigas Karina Preising e Tatiana Giordano com quem sempre posso contar. Ter morado com vocês acrescentou muito em minha vida! Obrigado por tudo! Saibam que a menor convivência não diminuiu em nada meu sentimento de amizade por vocês.

Aos amigos André, Heder, Daniel e Duroc, pela amizade e convívio excelente. Obrigada por tornar meus dias mais divertidos.

Aos colegas de pós-graduação: Dani, Fernanda, Carla, Gustavo, Ana Izabel, Claudinha, Antônio Silvio, João, Tati, Camila, Moisés, Luciana, Thiago, Rodrigo, Karina, Edinho, Giovanna pelo convívio e troca de idéias.

Aos funcionárias da Pós-Graduação Denise, Maria e Zé Roberto.

Ao Haras Ogar pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos animais.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Índices de Fertilidade, dados nacionais.....	23
Tabela 2: Índices de Fertilidade, dados internacionais.....	24
Tabela 3: Médias e desvios padrão, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP) das amostras de sêmen descongeladas, submetidas ao período de estabilização prévio a congelação nos sistemas Minitüb®, Botutainer® e Equitainer®	35
Tabela 4: Médias e desvios padrão, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob a curva C1 da máquina de congelação TK3000 e seu respectivo grupo controle (GC) congelado em caixa de isopor.....	36
Tabela 5: Médias e desvios padrão, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob a curva C2 da máquina de congelação TK3000 e seu respectivo grupo controle (GC) congelado em caixa de isopor.....	37
Tabela 6: Médias e desvios padrão, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob a curva C3 da máquina de congelação TK3000 e seu respectivo grupo controle (GC) congelado em caixa de isopor.....	37
Tabela 7: Número de éguas prenhes e não prenhes e índice de prenhez obtidos através da inseminação artificial de 46 ciclos de 23 éguas utilizando sêmen congelado sob a curva C2 da máquina de congelação TK3000 e do grupo controle, congelado em caixa de isopor.....	38
Tabela 8: Médias e desvios padrão dos parâmetros espermáticos motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP), em porcentagem, das amostras seminais que apresentaram motilidade total acima de 50% pós-descongelação, do grupo controle “GC” (caixa de isopor) e das curvas do grupo G2 e G3 (máquinas de congelação).....	39
Tabela 9: Médias e desvios padrão dos parâmetros espermáticos motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP), em porcentagem, das amostras seminais que apresentaram motilidade total abaixo de 50% pós-descongelação, do grupo controle “GC” (caixa de isopor) e das curvas do grupo G2 e G3 (máquinas de congelação).....	40

Tabela 10: Dados encontrados, em porcentagem, de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) das amostras de sêmen a fresco dos ejaculados utilizados no experimento I e II.....89

Tabela 11: Dados de motilidade total e progressiva e integridade de membrana plasmática por ejaculado, do sêmen descongelado submetido ao período de estabilização nos sistemas Minitüb[®], Botutainer[®] e Equitainer[®] previamente a congelação em caixa de isopor.....90

Tabela 12: Dados, em porcentagem, dos valores dos parâmetros espermáticos motilidade total por ejaculado, das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob as curvas C1, C2 e C3 da máquina de congelação TK 3000 e seus respectivos grupos controle (GC), congelados em caixa de isopor.....91

Tabela 13: Dados, em porcentagem, da avaliação dos parâmetros espermáticos motilidade progressiva por ejaculado, das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob as curvas C1, C2 e C3 da máquina de congelação TK 3000 e seus respectivos grupos controle (GC), congelados em caixa de isopor.....92

Tabela 14: Dados, em porcentagem, dos valores dos parâmetros espermáticos de integridade de membrana plasmática por ejaculado, das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob as curvas C1, C2 e C3 da máquina de congelação TK 3000 e seus respectivos grupos controle (GC), congelados em caixa de isopor.....93

Tabela 15: Dados da avaliação dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e progressiva (MP), por ejaculado, das amostras seminais refrigeradas a 5°C por 3 horas no sistema de transporte refrigerado Botutainer[®]94

Tabela 16: Dados, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP) por ejaculado, das amostras seminais descongeladas, obtidas através da congelação sob as curvas dos grupos G2 e G3 das máquinas de congelação TK3000 e do grupo controle “GC”, congelado em caixa de isopor.....95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Avaliação computadorizada (CASA) dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais apresentaram valores acima de 50% de motilidade total pós-descongelação. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.....41

Figura 2: Avaliação computadorizada (CASA) dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais apresentaram valores abaixo de 50% de motilidade total pós-descongelação. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.....41

Figura 3: Avaliação computadorizada (CASA) da motilidade progressiva dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais apresentaram valores acima de 50% de motilidade total pós-descongelação. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.....42

Figura 4: Avaliação computadorizada (CASA) da motilidade progressiva dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais apresentaram valores abaixo de 50% de motilidade total pós-descongelação. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.....42

Figura 5: Avaliação computadorizada (CASA) da integridade de membrana plasmática dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador, os quais apresentaram valores abaixo de 50% de motilidade total pós-descongelação. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.....43

Figura 6: Avaliação computadorizada (CASA) da integridade de membrana plasmática dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais apresentaram valores abaixo de 50% de motilidade total pós-descongelação. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.....43

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Bases Físico-Químicas da Criopreservação.....	3
2.2 Etapas da Congelação de Sêmen Equino	5
2.2.1 Centrifugação.....	5
2.2.2 Diluentes Crioprotetores.....	7
2.2.3 Estabilização.....	12
2.2.4 Curvas de Congelação	13
2.2.5 Congelação de Sêmen Equino Pós-Refrigeração.....	15
2.3 Métodos de Avaliação do Sêmen Criopreservado.....	16
2.3.1 Motilidade.....	17
2.3.1.1 Microscopia de Luz.....	17
2.3.1.2 Análise Computadorizada da Motilidade Espermática (CASA).....	18
2.3.2 Integridade de Membrana Plasmática.....	19
2.4 Variações inter e Intra-raciais na Viabilidade do sêmen Congelado equino.....	20
2.5 Fertilidade com Sêmen Congelado Equino.....	23
3. Material e Método.....	25
3.1 Experimento I.....	25
3.1.1 Animais.....	25
3.1.2 Colheita do Sêmen.....	25
3.1.3 Análises Laboratoriais.....	25
3.1.4 Processamento do Sêmen.....	26
3.2 Experimento II.....	28
3.2.1 Animais, Colheita do Sêmen e Análises Laboratoriais.....	28

3.2.2 Processamento do Sêmen.....	28
3.2.3 Teste de Fertilidade.....	30
3.3 Experimento III.....	31
3.3.1 Animais.....	31
3.3.2 Colheita do Sêmen.....	31
3.3.3 Análise Laboratorial.....	32
3.3.4 Processamento do Sêmen.....	32
3.4 Análise Estatística.....	34
4. Resultados.....	35
4.1 Experimento I.....	35
4.2 Experimento II.....	36
4.3 Teste de Fertilidade.....	38
4.4 Experimento III.....	39
5. Discussão.....	44
6. Conclusões.....	52
7. Considerações Finais.....	53
8. Referências Bibliográficas.....	54
9. Trabalho Científico.....	61
10. Anexos.....	86

De Vita, B., **Estudo de diferentes sistemas e curvas de congelação na eficiência da congelabilidade e fertilidade de Sêmen eqüino**. Botucatu, 2004. 101p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

O presente estudo objetivou comparar diferentes curvas de congelação utilizando-se uma máquina com curvas programadas (TK3000®) com congelação em vapor de nitrogênio líquido, utilizando sêmen de garanhões de alta e baixa congelabilidade. Comparou-se a eficácia do período de estabilização do sêmen em diferentes sistemas de transporte refrigerado (Botutainer® e Equitainer®) em relação à estabilização feita em refrigerador Minitüb® previamente à congelação. No experimento I e II foram utilizados 4 garanhões com sêmen de alta congelabilidade. As amostras foram refrigeradas durante 20 minutos previamente à congelação em refrigerador Minitüb® (GM), Botutainer® (GB) e Equitainer® (GE). Não houve diferença entre os grupos quanto a motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP): GM (67,1;32,1%); GB (65,2;31,9%); GE (63,4;30,4%) demonstrando que os dispositivos podem ser utilizados como uma alternativa aos refrigeradores. Os valores de integridade de membrana plasmática (IMP%) foram GM(49,43^a); GB(48,70^a); GE(44,90^b). No experimento II foram utilizadas 3 curvas programadas na TK3000® (C1, C2, C3) e a metodologia em caixa de isopor (GC). As comparações foram realizadas em relação ao GC e não apresentaram diferença significativa. Valores em porcentagem de MT, MP e IMP: GCxC1 (70 x 67,5; 35,7 x 32; 48,3 x 46); GCxC2 (63,3 x 67,66; 33,3 x 34,8; 45,4 x 48,3); GCxC3 (63,2 x 65; 32,2 x 32,4; 48,09 x 49,3). No teste de fertilidade, as inseminações foram realizadas com amostras congeladas com C2 e GC apresentando índices de prenhez de 65 e 60% respectivamente, sem diferença significativa. A TK3000® foi tão eficaz quanto à metodologia de congelação em caixa de isopor em relação à congelabilidade e fertilidade. Todas as curvas testadas foram eficientes na manutenção da viabilidade espermática. No experimento III, foram utilizados 8 garanhões da raça Mangalarga Marchador. As amostras foram divididas e congeladas simultaneamente em duas máquinas em diferentes curvas (G2 e G3) e na caixa de isopor (GC). Para a análise estatística, as amostras seminais foram divididas em dois grupos de acordo com a motilidade total pós-descongelação (acima ou abaixo de 50%). Os resultados das amostras que apresentaram índice acima de 50% pós-descongelação: MT (GC:61,8%^b; G2: 75,0%^a; G3: 66,3%^{ab}); MP (GC: 28,0%^b; G2:41,0%^a; G3: 27,5%^b); IMP (GC: 51,3%^a; G2: 55,0%^a e G3: 53,5%^a), demonstram superioridade significativa do G2 em relação GC na MT e do G2 em relação ao GC e G3 na MP. Os resultados das amostras que apresentaram índice abaixo de 50% pós-descongelação MT (GC: 13,3%^b; G2: 20,5%^a; G3: 19,5%^{ab}); MP (GC: 3,8%^a; G2: 6,8%^a; G3: 6,0%^a); IMP (GC:16,8%^a; G2: 20,8%^a e G3: 19,5%^a), demonstram superioridade do G2 na MT. A curva mais rápida da TK3000® demonstrou ser mais eficaz na congelabilidade de animais da raça Mangalarga Marchador considerados “poor freezers”

Palavras-chave: Eqüino; Sêmen; Curvas de Congelação; Fertilidade

De Vita, B., **Influence of different systems and freezing ratios in equine semen freezability and fertility**. Botucatu, 2004. 95p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

This present study compared freezing ratios in a programmable freezer (TK3000) performed by usual methodology, using good freezers and poor freezers stallions. The semen stabilization period efficiency was compared in cooled semen transport systems (Botutainer® e Equitainer®) in relation with Minitüb® fridge before the cryopreservation. Four good freezers stallions was used in experiments I and II. Samples were cooled during 20 minutes before the cryopreservation in a Minitüb® fridge (GM), Botutainer® (GB) and Equitainer® (GE). There was not difference between groups in relation with total motility (TM) and progressive motility (PM): CM (67,1;32,1%); GB (65,2;31,9%); GE (63,4;30,4%) showing that transport systems can be used as an alternative instead of fridges. Plasma membrane integrity (MPI%) values were CM (49,43^a); GB (48,70^a); GE (44,90^b). Three frozen ratios were used in experiment II in the TK3000® (C1, C2, C3) and the isothermic box (CG). Results from each freezing ratio were compared to the control group and no difference was observed. Percentage values from TM, PM and MPI were the following: CGxC1 (70x67,5; 35,7x32; 48,3x46); CGxC2 (63,3x67,66; 33,3x34,8; 45,4x48,3); CGxC3 (63,2x65; 32,2x32,4; 48,09x49,3). In the fertility test, artificial inseminations were performed with C2 and GC frozen samples showing pregnancy rates of 65 and 60%, respectively, without significant difference. The TK3000® was as efficient as the isothermic box frozen methodology in relation to freezability and fertility. All freezing ratios were efficient in semen viability maintenance. Ten Mangalarga Marchador breed stallions were used in the experiment III. The samples were shared and frozen simultaneously in two programmable freezers with different ratios (G2 e G3) and in an isothermic box (CG). For the statistical analysis, semen samples were divided in two groups in according to post-thawed total motility (under or above of 50%). Samples results that showed rates above 50%: TM (CG: 61,8%^b; G2: 75,0%^a; G3: 66,3%^{ab}); PM (CG: 28,0%^b; G2: 41,0%^a; G3: 27,5%^b); PMI (CG: 51,3%^a; G2: 55,0%^a and G3: 53,5%^a), showed significant superiority of G2 in relation to CG in MT and G2 in relation to CG and G3 in MP. Samples results that showed rates under 50% post-thawed TM (CG: 13,3%^b; G2: 20,5%^a; G3: 19,5%^{ab}); PM (CG: 3,8%^a; G2: 6,8%^a; G3: 6,0%^a); PMI (CG: 16,8%^a; G2: 20,8%^a e G3: 19,5%^a), showed superiority of G2 in TM. The TK3000® fastest freezing ratio showed to be more efficient in the semen freezability of poor freezers Mangalarga Marchador breed stallions.

Keys Words: Equine; Semen; Freezing Ratios; Fertility

1 Introdução

O desenvolvimento de biotecnologias cada vez mais modernas tem contribuído para os avanços na área de Reprodução Animal. A criopreservação de sêmen se destaca por suas inúmeras vantagens: diminuição de custos com aquisição de animais geneticamente superiores; armazenamento por tempo indeterminado; utilização do sêmen de animais excepcionais mesmo após a perda da capacidade reprodutiva ou morte; racionalização do uso do reprodutor com aumento da relação macho/fêmea; controle de doenças venéreas e facilidade no transporte a longas distâncias.

A retomada do crescimento da indústria do cavalo nos últimos anos, favorecida pela liberação da utilização das biotécnicas por diversas associações de criadores, contribuiu para impulsionar as pesquisas e melhorar o potencial genético de nosso plantel. O plantel brasileiro é o segundo maior do mundo com 5,9 milhões de cabeças gerando 500 mil empregos diretos.

Embora as inovações das técnicas de congelamento de sêmen eqüino tenham proporcionado uma grande melhora aos índices de fertilidade na última década, os resultados laboratoriais e índices de prenhez ainda são variáveis, demonstrando a necessidade do estabelecimento de uma padronização da metodologia.

Na espécie eqüina, especialmente, esse quadro é agravado pela grande variação entre garanhões e entre ejaculados de um mesmo garanhão na habilidade de suportar o processo de criopreservação. Em vista disto, muitos estudos têm buscado aumentar a eficiência do processo de congelamento, por meio da melhoria dos diluentes, dispositivos de refrigeração, intensidade e tempo de centrifugação, curvas adequadas à criopreservação e metodologias de inseminação artificial.

Porém, o processo de criopreservação de sêmen eqüino envolve inúmeros processos físico-químicos que são responsáveis pela integridade e viabilidade espermática, assim como pela fertilidade do sêmen congelado eqüino (Graham, 1996). Segundo Wolfe e Briant (2001) estes eventos físico-químicos a baixas temperaturas são capazes de inviabilizar as células submetidas à criopreservação. Alguns estudos já foram publicados demonstrando taxas de refrigeração adequadas para evitar as alterações causadas pelo choque frio durante a refrigeração e o efeito de solução durante a congelação de sêmen eqüino, porém os dispositivos comumente utilizados para estes processos são dispositivos passivos, podendo levar a variações dessas taxas por influência da temperatura ambiente, temperatura inicial da amostra e massa da mesma.

Em busca de minimizar estes efeitos, foram desenvolvidas máquinas de congelação espermática que permitem o controle automatizado da queda de temperatura. Tais máquinas já existem há algum tempo no exterior, porém, em decorrência de seu alto custo e de não serem portáteis, são pouco utilizadas no Brasil.

O presente estudo teve por objetivo testar a eficiência de diferentes curvas de congelação inseridas num aparelho computadorizado, nacional e portátil (TK3000[®]) e compará-las com a metodologia usual de congelação em caixa de isopor, utilizando garanhões que apresentam sêmen de alta e baixa congelabilidade, bem como avaliar a eficácia do período de estabilização do sêmen em sistemas de transporte refrigerado (Botutainer[®] e Equitainer[®]) em comparação a estabilização feita em refrigerador programável Minitüb[®] previamente a congelação.

2 Revisão de Literatura

2.1 Bases Físico-Químicas da Criopreservação

A exposição das células espermáticas à temperatura abaixo das fisiológicas, mesmo antes de ocorrer a congelação, é responsável por mudanças na organização bidimensional dos lipídeos da membrana e também por alterações das propriedades de enzimas encontradas na membrana, diminuindo a longevidade dos espermatozóides após a descongelação, através do adiantamento da capacitação espermática (Holt, 2000).

Quando uma suspensão celular é refrigerada abaixo de 0°C, ocorre a formação de cristais de gelo extracelulares, resultando numa concentração de solutos no líquido remanescente. Tanto a formação de grandes cristais, quanto à concentração intracelular de solutos e modificações correlacionadas que resultam na desidração das células durante a criopreservação podem levar a danos reversíveis ou não ao espermatozóide (Pickett & Amann, 1993). Porém, a desidratação é um evento desejável, pois reduz a probabilidade de se formarem grandes cristais de gelo dentro da célula que causariam danos às estruturas internas e/ou da membrana plasmática (Squires et al., 1999).

Segundo Mazur (1977), uma curva de congelação ótima deve ser lenta o suficiente para prevenir a formação do gelo intracelular, porém rápida o bastante para prevenir as crioinjúrias ligadas aos efeitos osmóticos.

Se a célula for congelada rapidamente, não há tempo suficiente para que esta desidrate e mantenha o equilíbrio osmótico, com possibilidade de formação de cristais de gelo intracelulares. Neste caso, como os espermatozóides não terão sofrido desidratação conforme o gelo extracelular derreter, não haverá grande

influxo de água, devendo então ser descongelado rapidamente, de modo que o gelo intracelular que se formou durante a congelação não tenha tempo para recrystalizar (Amann & Pickett, 1987).

Em contrapartida, se as células forem congeladas numa velocidade mais lenta, elas desidratam por causa do meio extracelular super concentrado, eliminando a possibilidade de formação de grandes cristais podendo, no entanto, sofrer danos morfofuncionais devido à desidratação e exposição a elevadas concentrações de solutos em seu interior (Mazur, 1977). Sendo assim, a descongelação também deverá ser lenta para permitir a fusão dos cristais de gelo extracelulares.

A descongelação destes cristais provoca diluição dos solutos e lentamente ocorre a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado rapidamente, os cristais extracelulares descongelam-se muito rapidamente e a água invade bruscamente as células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática (Holt, 2000).

A facilidade de transporte de água depende da permeabilidade da membrana espermática a qualquer temperatura, determinada pela proporção superfície-volume e pelo índice de congelação. Se a célula for suficientemente permeável à água ou o índice de congelação for suficientemente baixo, a pressão permanece pequena, aumentando a concentração de solutos ao redor dos espermatozóides e alternando o gradiente osmótico; assim, desidratação à medida que a água saia da célula para se congelar no meio extracelular, ocorre a desidratação. Embora os cristais de gelo deformem a célula, eles não são capazes de romper a membrana plasmática (Amann & Pickett, 1987; Jasko, 1994).

2.2 Etapas da Congelação de Sêmen Eqüino

2.2.1 Centrifugação

A centrifugação é uma etapa indispensável para o procedimento de congelação e tem como funções eliminar o plasma seminal e promover um sedimento altamente concentrado em espermatozóides. Esta concentração é essencial, porque permite o envasamento do sêmen em doses únicas (macrotubos), ou em palhetas de 0,5 mL, que facilita a atividade a campo. Os efeitos deletérios deste procedimento podem ser minimizados com a utilização de diluidores específicos para este fim e utilização de baixas forças de centrifugação 400 a 550x g (Jasko, 1994; Heitland et al., 1996). Pickett et al. (1975) concluíram que as centrifugações entre 370 e 829x g não produziram efeito deletério no sêmen.

A diluição do sêmen antes de ser centrifugado é realizada em diferentes proporções, que variam de 1:1 a 1:4, ou com concentrações de 50 a 80 x 10⁶/mL com soluções a base de glicose-EDTA, Ringer com lactato de sódio ou diluidores a base de leite (Papa et al., 1988).

O tempo de centrifugação pode ser definido de acordo com características individuais do sêmen de cada garanhão. Longos períodos de centrifugação, acima de 12 minutos, resultam numa alta recuperação espermática, contudo predispõem as células a possíveis injúrias. A centrifugação feita a 600x g por dez minutos apresentou recuperação espermática de 87%, sem alterações significativas nos parâmetros espermáticos, tratando-se então de intensidade e tempo de centrifugação recomendáveis (Dell'Aqua Jr., 2000).

Para alguns garanhões, a recuperação de espermatozóides chega a 80% sem influenciar na motilidade do sêmen, porém, para os que possuem baixa

motilidade espermática inicial, requer-se uma centrifugação mais vagarosa, para evitar a perda excessiva de espermatozóides (Neves Neto, 2004).

Após a centrifugação, o sobrenadante é aspirado restando apenas o “pellet” de espermatozóides formado no fundo do tubo da centrífuga, que será ressuspendido, com um diluidor de congelação a um volume apropriado para a concentração e forma de acondicionamento do sêmen (Jasko, 1994).

2.2.2 Diluentes e Crioprotetores

Os espermatozóides passam por um processo contínuo de transformações, desde a sua formação nos testículos até o momento da fertilização no oviduto. Quando as células espermáticas são resfriadas e/ou congeladas, na tentativa de prolongar sua vida útil e facilitar o transporte até a égua, seu ciclo fisiológico é interrompido além de provocar diversas alterações que podem ser reversíveis ou não, mas que afetam a capacidade fecundante do espermatozóide. Para que a criopreservação tenha sucesso, é necessário que o espermatozóide seja colocado em um ambiente apropriado (diluidor), que minimize os danos nas membranas, e não acione prematuramente o mecanismo de capacitação espermática e a reação do acrossomo (Loomis, 1992).

Para a diluição do sêmen eqüino há necessidade da formulação de diluentes de congelação utilizando substâncias químicas e/ou biológicas puras e equipamentos adequados, com o objetivo de excluir materiais tóxicos e impurezas do ambiente do sêmen. Os diluidores deve ser preparados assepticamente e quando não congelados, estocados no período máximo de umas semana. Os carboidratos como a glicose, lactose entre outros, usualmente são adicionados como fonte de energia para os espermatozóides (Squires et al., 1987).

Tanto a gema de ovo quanto o leite desnatado, que também contém nutrientes utilizados pelos espermatozóides, são usados para proteger as células espermáticas contra o “choque-frio”, a medida que elas são resfriadas de 37 °C para 5 °C. Uma variedade de tampões pode ser usada para manter o pH aproximadamente neutro (6,8 a 7,2) e uma pressão osmótica próxima de 320 miliosmóis/Kg de água, equivalente a do sêmen (Squires et al., 1987).

Para inibir o crescimento de microorganismos no sêmen, são utilizados vários antibióticos como a penicilina, estreptomicina, kanamicina, gentamicina entre outros, além de combinações entre estes que atuam como largo espectro bactericida (Picket et al., 1987).

Neves Neto (2004), relatou que na grande maioria dos estudos com sêmen congelado eqüino, o diluidor empregado é o meio Lactose-EDTA-gema de ovo, proposto por Martin et al. (1979), com resultados de fertilidade bastante variados entre os diversos trabalhos publicados.

Em 1993, Papa et al. testaram a eficiência de um novo diluidor para congelação de sêmen a base de glicina-gema de ovo comparando-o com o meio lactose-EDTA-gema de ovo e observaram melhores índices de motilidade, vigor espermático e integridade de acrossoma com a utilização do novo diluidor.

Zahn et al. (2002) observaram melhores resultados de prenhez quando utilizaram o meio MP50 (Papa et al., 2002) em comparação ao diluidor M9 (Papa et al., 1998). Em 2004, Neves Neto concluiu que a utilização dos diluidores BME-adaptado, MP50 e FR-4 foram eficientes para a biotecnologia de criopreservação de sêmen equino.

Vidament (2005) comparou os diluentes Lactose-Glucose-EDTA modificado (Cochran et al., 1984); INRA-82 (Palmer, 1984) e Kenney Frozen Extender (Burns,

1982) e observou que a motilidade pós descongelação foi maior quando utilizado o meio INRA82 em relação ao meio Lactose-glicose-EDTA, porém o meio Kenney FE apresentou motilidade pós descongelação maior do que o meio INRA82. No entanto, a porcentagem de acrossomos íntegros e o índice de prenhez por ciclo foram claramente reduzidos quando o sêmen foi preparado com o meio Kenney Frozen Extender (38%) em relação ao meio INRA82 (63%).

Pasquini et al. (2007) compararam os três diluentes atualmente mais utilizados no mundo: INRA-82, Lactose-EDTA-gema de ovo e Botu-Crio® e observaram que em relação aos parâmetros motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de espermatozóides rápidos, o diluente Botu-Crio® foi superior aos demais diluentes estudados.

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio diluente para que haja uma proteção do espermatozóide durante a criopreservação e descongelação. Ao longo de vários anos uma gama de substâncias tem sido utilizada para fornecer proteção adequada às células espermáticas durante a criopreservação (Squires et al., 1999; Arruda, 2000).

Keith (1998) relatou a existência de uma divisão básica que agrega os crioprotetores em penetrantes e não penetrantes. Os crioprotetores não penetrantes são algumas substâncias, dentre as quais lipídeos, lipoproteínas e macromoléculas como por exemplo: gema de ovo, leite, alguns açúcares e a albumina sérica bovina, eficientes na proteção dos espermatozóides durante a congelação sem que para isto necessitem penetrar nas células. Estes crioprotetores não penetrantes protegem as células através de mecanismos osmóticos, promovendo um meio hipertônico que induz a saída de água das células, levando à desidratação do espermatozóide e

reduzindo a probabilidade de formação de cristais de gelo no interior da célula (Amann & Pickett, 1987).

Os crioprotetores penetrantes são substâncias que atuam tanto no meio intra como extracelular, sendo mais comumente utilizados o glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO) e amidas (Keith, 1998). Acredita-se que os crioprotetores penetrantes atuem através de propriedades de ligação com a água ou por propriedades coligativas (Watson, 1979).

Nos protocolos de criopreservação de sêmen eqüino, o crioprotetor mais utilizado é o glicerol (Martin et al. 1979; Papa, 1987, Graham, 1996). Porém, o uso do glicerol pode estar relacionado à baixa motilidade pós descongelação e à redução da fertilidade. Sua toxicidade parece causar desnaturação das proteínas, alterações nas interações da actina, além de ocasionar mudanças nos eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade pelo glicerol intracelular, modificações na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos, atuação direta na membrana plasmática, alterações no glicocálix e nas proteínas de superfície celular (Hammerstedt & Graham, 1992).

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

A adição e remoção do glicerol no sêmen eqüino ocasionam redução da motilidade, diminuição da integridade de membrana celular e acrossomal,

demonstrando um maior estresse osmótico em comparação com outros crioprotetores (Ball & VO, 2001).

Com a hipótese de que o Glicerol pudesse levar a efeitos prejudiciais na congelação de espermatozóides eqüinos, diversas pesquisas foram iniciadas no intuito de estudar substâncias alternativas a este crioprotetor. Comparando os efeitos do etilenoglicol e do glicerol, Alvarenga et al.(2000a) demonstraram atuação semelhante de ambos, sendo que quando combinados possibilitam a redução do teor de glicerol, diminuindo seu efeito tóxico. Em outro estudo comparativo entre o glicerol e outros crioprotetores, dentre eles etilenoglicol, dimetilformamida e dimetilsulfóxido, utilizando dez ejaculados de dez garanhões, constatou-se a equivalência no uso dos crioprotetores com exceção do dimetilsulfóxido, o qual apresentou resultado inferior (Alvarenga et al., 2000b).

Na mesma linha de pesquisa em 2003, Rossi et al. compararam os efeitos dos crioprotetores dimetilformamida 2% + dimetilsulfóxido 2%, dimetilformamida 3%, metilformamida 2% + glicerol 2 %, dimetil-acetamida 2% + glicerol 2%; metilformamida 3%; dimetil-acetamida 3% no meio MP50 e o diluente MP50 em sua formulação original (dimetil-formamida 2% + glicerol 3%) e observaram que não houve diferença entre os crioprotetores e suas associações para os parâmetros analisados (motilidade total e integridade de membrana).

Já Neves Neto (2004), relatou que o glicerol a 5% no diluidor BME-adaptado foi superior aos crioprotetores etilenoglicol e dimetilformamida a 5%,e também à associação dos crioprotetores glicerol a 3% e etilenoglicol a 2% na habilidade de preservar o espermatozóide eqüino durante a congelação e descongelação.

Em 2006, Melo et al., demonstraram que o crioprotetor dimetilacetamida mostrou-se superior na proteção espermática durante o processo de congelação em

relação à dimetilformamida, apesar das amidas utilizadas apresentarem estruturas químicas semelhantes.

Ferreira et al. (2007) testaram o uso de diferentes concentrações de glicerol e metilformamida na criopreservação de sêmen eqüino no meio INRA82 e concluíram que a eficiência da metilformamida foi superior ao uso do glicerol e as concentrações de 2% de glicerol e 3% de metilformamida foram mais adequadas na proteção contra as crioinjúrias da célula espermática.

Medeiros et al. (2007), concluíram que, sob estresse osmótico, os crioprotetores a base de amidas são superiores ao glicerol em preservar a motilidade e a integridade de membrana dos espermatozóides de garanhões e levantaram a hipótese de que a menor viscosidade dos crioprotetores a base de amidas associada ao seu menor peso molecular, quando comparado ao glicerol, permite uma melhor permeabilidade destes crioprotetores através da membrana plasmática, induzindo conseqüentemente um menor dano osmótico.

Visando estudar variações individuais e raciais quando da congelação com glicerol ou dimetilformamida a 5% em meio diluente a base de leite desnatado e gema de ovo desenvolvido por Palmer (1984), Alvarenga (2002) observou que um maior percentual de garanhões apresentou sêmen de boa congelabilidade com o uso da dimetilformamida. Tanto as diferenças favoráveis a este crioprotetor quanto a melhoria da motilidade pós descongelação foram mais marcantes nos reprodutores menos resistentes ao processo de congelação de sêmen.

Em relação ao uso do glicerol e na avaliação da fertilidade de garanhões de alta e baixa congelabilidade submetidos ao estresse osmótico com soluções hipersaturadas de crioprotetores a base de amidas (dimetilacetamida, metilformamida, dimetilformamida) e glicerol na concentração de 1 molar, houve uma

diferença entre indivíduos de padrões diferentes de congelabilidade em relação à resistência osmótica dos espermatozóides aos crioprotetores. Segundo os autores, este fato está relacionado a uma maior eficiência das células espermáticas de indivíduos com sêmen de alta congelabilidade à regulação do equilíbrio osmótico celular (Medeiros et al., 2007).

2.2.3 Estabilização

Alguns protocolos incluem um período de resfriamento do sêmen antes da congelação com o objetivo de recuperar as células espermáticas dos efeitos da centrifugação e diminuir as injúrias que podem ter sido causadas pelo choque frio (Jasko, 1994). A ocorrência do choque pelo frio pode ser evitada ou amenizada refrigerando-se lentamente o sêmen eqüino diluído até 4°C, a taxas iguais ou inferiores a 0,05°C/min (Pickett & Amann, 1993).

O termo choque frio define algumas modificações que ocorrem no espermatozóide quando submetido a uma curva de refrigeração rápida (Jasko, 1994). Esse processo se caracteriza por padrão anormal de movimento espermático, perda rápida de motilidade, danos no acrossoma e membrana plasmática, redução do metabolismo e perda dos componentes intracelulares (Amann & Graham, 1992).

Squires et al. (1999) relataram que os componentes da membrana plasmática (lipídeos e proteínas) se movimentam lateralmente dentro da cabeça, acrossoma, e “colo” do espermatozóide. Esse estado normal da membrana é chamado estado líquido cristalino. A refrigeração altera a orientação dos lipídeos afetando a estabilidade da membrana ou induzindo a um desarranjo das moléculas, com

formação de pontos de fragilidade que levam a uma permeabilidade excessiva ou mesmo à ruptura da membrana (Amann & Graham, 1992).

As injúrias causadas por essas alterações na célula durante a refrigeração podem acontecer de forma direta afetando as estruturas celulares, pela ruptura da membrana e conseqüentes modificações bioquímicas e metabólicas que são imediatamente evidentes pela alteração na motilidade, ou de forma indireta, pela alteração das funções celulares, como diminuição dos processos metabólicos (Kayser et al., 1992; Squires et al., 1999).

A despeito da conhecida sensibilidade do espermatozóide eqüino ao choque pelo frio, alguns estudos foram desenvolvidos com o intuito de avaliar a possibilidade de se congelar sêmen de garanhões sem refrigeração prévia. Em dois estudos, um realizado por Vidament (2000) em que se utilizou o diluente INRA 82 e outro em que o sêmen foi congelado por Füst et al. (2003) em meio à base de lactose-EDTA-gema de ovo, houve queda significativa na motilidade pós-descongelação quando não se realizou a refrigeração antes da congelação em ambos os trabalhos.

2.2.4 Curvas de Congelação

O processo de congelação de sêmen eqüino envolve inúmeros eventos físico-químicos que são responsáveis pela integridade e viabilidade espermática, assim como pela fertilidade do sêmen congelado eqüino (Graham, 1996).

A busca de taxas ótimas de refrigeração/congelação e descongelação das células espermáticas tem sido motivo de estudos em diversas espécies de animais. Fiser e Fairfull (1990) estudaram os fatores velocidade de congelação, nível de glicerol no meio de congelação e sistema de envase para o sêmen de suínos. Os melhores resultados de motilidade e integridade acrossomal foram obtidos com a

utilização de 3% de glicerol no meio diluente e uma velocidade de congelação de 30°C/min com o sêmen acondicionado em palhetas de 0,5 mL.

Em outro estudo, espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo de cães foram congelados em palhetas de 0,25 mL a diferentes taxas (0,5, 3, 11, 58 ou 209°C/min). As taxas de 0,5 e 3°C/min foram obtidas utilizando-se dispositivos próprios para congelação, enquanto as taxas de 11, 58 e 209°C/min foram determinadas pela distância entre as palhetas e o nitrogênio líquido. A motilidade espermática após a descongelação foi reduzida com baixas taxas de congelação, atingiu valores máximos à taxa de 11°C/min e diminuiu significativamente ($P<0,01$) com taxas de congelação mais elevadas (YU et al., 2002).

Blanco et al (2000) compararam a sobrevivência espermática após congelação rápida (50°C/min) ou lenta (1°C/min de +4 a -20°C seguido de 2°C/min de -20 a -70°C) do sêmen de seis espécies de aves (galo, peru, águia dourada, águia de Bonelli, águia imperial e falcão peregrino) e observaram que a congelação rápida foi prejudicial em quatro das seis espécies estudadas, mostrando as variações interespecíficas existentes.

A comparação de três métodos de congelação de sêmen suíno por meio de máquinas mostrou resultados significativamente superiores em parâmetros de motilidade computadorizada e viabilidade espermática quando foram usados equipamentos que impunham uma velocidade de congelação em torno de 40°C/min em comparação à velocidade de congelação de 6°C/min (Thurston et al., 2003).

Kumar et al. (2003), compararam as curvas de 1 °C/min, 30 °C/min e 50 °C/min para a congelação de sêmen de bovino, ovino e suíno em duas máquinas programáveis de congelação, sendo uma comercial (Planer Cryo 10[®]) e outra

máquina não comercial desenvolvida por Medrano et al. (2002). Os autores concluíram que a curva de 30°C/min e que a máquina desenvolvida por Medrano foram mais eficientes entre manutenção da viabilidade espermática nas três espécies estudadas.

A avaliação da permeabilidade da membrana espermática à água durante a congelação a diferentes taxas, mostrou que as taxas de congelação de 29°C/Min e 60°C/Min são as mais adequadas à congelação de sêmen de garanhões em meios diluidores com e sem crioprotetor (Devireddy et al., 2002).

Um recente trabalho (Clulow et al, 2007) demonstrou que a motilidade total pós-descongelação de amostras em diferentes concentrações (40 e 400×10^6) e diferentes volumes ($0,25$ e $0,5\text{mL}$) foi consistentemente mais alta quando a congelação foi feita em máquina de congelação programável, em comparação a utilização da caixa Styrofoam[®] contendo nitrogênio líquido. A curva programada na máquina de congelação Planer Kryo[®] foi de 50°C/min. por um minuto, seguida de 10°C/min. por seis minutos e aumentando gradativamente até 50°C/min. até que a temperatura das amostras atingisse 110°C. Posteriormente esta taxa foi mantida até que temperatura das palhetas alcançassem 150°C. Esta curva foi baseada na taxa de congelação da caixa Styrofoam[®], observada em mensuração prévia.

2.2.5 Congelação de Sêmen Equino Pós-Refrigeração

Além dos estudos em relação às taxas de congelação mais adequadas para a criopreservação de sêmen das diferentes espécies, facilitados pelo surgimento de equipamentos automatizados nos quais as curvas podem ser programadas e

controladas em máquinas computadorizadas, algumas pesquisas demonstraram uma nova técnica de congelação após 24 horas de refrigeração (Crocket et al., 2001; Beckamn et al 2004; Melo, 2005).

Segundo Crocket et al. (2001), observaram que a congelação após 24 horas de refrigeração resultou na redução da motilidade progressiva. No entanto, a congelação de sêmen refrigerado por 18 horas não afetou a viabilidade e a fertilidade na pesquisa de Beckman et al., (2004). Melo (2005), demonstrou que a congelação após 24 horas de refrigeração foi tão eficiente quanto a convencional na manutenção da viabilidade espermática, bem como dos índices de fertilidade.

2.3 Métodos de Avaliação do Sêmen Criopreservado

Após os procedimentos de refrigeração e congelação, o sêmen congelado eqüino deve ser analisado laboratorialmente com o objetivo de averiguar a intensidade dos danos causados a célula espermática. Porém, alguns autores afirmaram que os ensaios desenvolvidos atualmente não podem ser correlacionados consistentemente com a fertilidade das amostras seminais (Katila, 2001). As possíveis causas para este fato, poderiam ser a própria complexidade do espermatozóide, a colheita de dados sobre a fertilidade, e os fatores envolvidos na padronização da análise espermática (Graham e Mocé, 2005). Os mesmos autores relatam que muitos estudos são realizados visando prever a fertilidade do sêmen congelado eqüino baseando-se nos testes laboratoriais. Apesar das dificuldades para encontrar essas correlações, a importância de se conduzir ensaios laboratoriais em todas as amostras seminais usadas para inseminação artificial ou para

determinar causas de infertilidade dependem desses resultados (Graham e Mocé, 2005).

2.3.1 Motilidade

Segundo Katila (2001), a motilidade espermática é importante porque reflete diversos aspectos do metabolismo espermático. No entanto para estimar o potencial fertilizante do sêmen, a motilidade deve ser avaliada em conjunto com outros parâmetros seminais.

O espermatozóide eqüino apresenta diversas características espécie-específicas como cabeça assimétrica, inserção abaxial da cauda e acrossoma de pequeno volume. O movimento circular aberto, por exemplo, pode ser encontrado em espermatozóides normais pela alta incidência de inserção abaxial da cauda do espermatozóide em equinos (Kenney et al 1983). Portanto, a avaliação da motilidade não deve levar em consideração apenas a motilidade progressiva, pois pode estar sub-estimando a boa motilidade do sêmen de alguns garanhões (Katila, 2001).

2.3.1.1 Microscopia de Luz

A avaliação da motilidade espermática por microscopia de luz envolve estimativas subjetivas da viabilidade dos espermatozóides e da qualidade da motilidade. Portanto, para estimativa deste parâmetro, é necessária um técnico com muita prática e um microscópio adequadamente equipado. O movimento espermático é extremamente suscetível às condições ambientais, de modo que é

necessário proteger o sêmen de condições ou agentes prejudiciais antes da análise (Ax et al., 2004).

Segundo Jasko et al. (1992), uma baixa correlação foi encontrada entre fertilidade e motilidade total ($r=0,40$) e entre fertilidade e motilidade progressiva ($r=0,46$) quando utilizadas inseminações artificiais com sêmen à fresco. Com a utilização de sêmen congelado, o coeficiente de correlação encontrado foi de apenas 0,32 (Samper et al., 1991). Este fato pode ser explicado pelo número insuficiente de fêmeas inseminadas para resultar em significância estatística, devido ao alto custo de trabalhos deste tipo (Katila, 2001).

Uma baixa motilidade espermática pode sugerir a não utilização de uma amostra seminal, porém uma boa motilidade não indica necessariamente que a capacidade fertilizante dos espermatozóides será mantida, devido à interação dos fluídos genitais femininos com a motilidade espermática (Blach et al., 1989).

2.3.1.2 Análise Computadorizada da Motilidade Espermática (CASA)

A avaliação computadorizada do sêmen permite avaliar a motilidade seminal de forma objetiva, ou seja, sem a possibilidade de erros humanos e influências “tendenciosas” por parte do examinador. Este sistema permite ainda que as velocidades dos espermatozóides sejam determinadas e alguns sistemas podem ser equipados com a capacidade de avaliar também a morfologia das células espermáticas (Graham & Mocé, 2005). O sistema de avaliação de morfologia automática foi validado para o sêmen humano, mas não para o sêmen eqüino (Katila, 2001).

As características específicas de motilidade nem sempre demonstram a qualidade do sêmen a fresco ou congelado de garanhões, pois não existem valores definidos para características de movimento espermático normais ou anormais. Não existem, tampouco, padrões internacionais estabelecidos na espécie eqüina de valores máximos ou mínimos para tamanho de cabeça, brilho, velocidades mínimas ou retilinearidade dos espermatozóides. O estabelecimento destes valores é uma necessidade urgente para os utilizadores do sistema de análise espermática computadorizada (Katila, 2001).

Em um trabalho francês nenhum dos parâmetros mensurados pelo CASA (VCL,LIN,ALH,MOT,RAP) teve correlação significativa com a fertilidade (Palmer & Magistrini, 1992).

A superioridade da análise espermática automática ainda não está comprovada, no entanto este é ainda, o único método de avaliar com acurácia parâmetros como velocidade e linearidade (Katila, 2001).

2.3.2 Integridade de Membrana Plasmática

Todos os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a predição da capacidade fertilizante do sêmen. Dentre estes exames a técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por suas características de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara (Celeghini, 2005).

A utilização de sondas fluorescentes necessita de um microscópio de epifluorescência. Segundo Colenbrander et al. (2003), combinações das sondas fluorescentes Diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídeo (IP), ou SYBER-14 e IP, são normalmente utilizadas. A CFDA é permeável à membrana e

sofre a ação de esterases dentro da célula íntegra, emitindo fluorescência verde. O IP não é permeável à membrana plasmática íntegra e, quando em contato com o núcleo de uma célula com a membrana plasmática rompida, transmite fluorescência de cor vermelha (Graham & Mocé, 2005). Já o SYBER-14, por ser permeável à membrana, emite fluorescência verde em contato o núcleo de todas as células. Porém, quando utilizada juntamente com o IP, nas células com danos na membrana, a fluorescência transmitida pelo IP é maior, resultando numa coloração vermelho-alaranjada (Garner & Johnson, 1995).

Zúccari (1998) trabalhando com fluorocromo CFDA e IP, observou em sêmen congelado de garanhões uma boa correlação entre a perda de motilidade durante a incubação com o aumento do percentual de membranas lesadas.

2.4 Variações Inter e Intra-Raciais na Viabilidade de Sêmen Congelado Eqüino

A criopreservação de sêmen bovino é utilizada comercialmente há décadas. Atualmente, a utilização desta biotecnologia apresenta taxas de concepção equivalentes ou ainda melhores do que as obtidas com a utilização de sêmen a fresco. No entanto, este fato não é observado na maioria das espécies de mamíferos nas quais a fertilidade é claramente reduzida após os protocolos de criopreservação (Watson, 2000). Este fato pode ser em parte explicado pelo descarte de animais de baixa fertilidade e baixa resistência a congelação na criação de bovinos, que tem permitido a seleção de indivíduos e linhagens, favorecendo a melhoria na fertilidade do sêmen congelado (Alvarenga, 2002).

Na equideocultura, não há nenhum tipo de seleção por aptidão a congelação e os parâmetros seminais podem variar tanto entre as raças como entre indivíduos

da mesma raça. Amann et al. (1987), avaliaram 136 ejaculados de 17 garanhões e verificaram que 80% da variação na porcentagem de espermatozóides com motilidade progressiva imediatamente após a descongelação, foi associada a ejaculados de um mesmo garanhão e 20% entre os garanhões.

Alvarenga et al., em 1996, observaram que as raças Mangalarga Paulista e Mangalarga Marchador tiveram menor aproveitamento em comparação à raças de origem germânica e Quarto de Milha, na avaliação da congelabilidade de 90 ejaculados de diferentes raças, demonstrando haver um fator racial relacionado a resistência do sêmen ao processo de congelação. Esta hipótese foi reforçada pelo mesmo autor, quando concluiu que os garanhões da raça Mangalarga Marchador apresentaram uma menor resistência ao processo de congelação e descongelação do sêmen em relação a outras raças estudadas (Alvarenga, 2002).

Apesar das causas determinantes da variabilidade da resistência do sêmen ao processo de congelação ainda não serem bem elucidadas, alguns estudos têm observado que esta variabilidade pode estar relacionada a fatores genéticos. Em suínos, demonstrou-se haver correlação entre o formato de cabeça do espermatozóide suíno e fertilidade, além da existência de marcadores genéticos para congelabilidade (Thurston et al., 2001; Thurston et al., 2002).

Reforçando esta idéia, pesquisas demonstraram que, quanto maior a fluidez da membrana antes do congelamento, melhor a resposta à congelação (Giraud et al., 2000) e que espécies que apresentam baixas concentrações de colesterol e altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados são mais predispostas aos danos do choque-frio, já que o processo de congelação leva a um enrijecimento da membrana plasmática (Darin-Bennett et al., 1973).

Holt (2000) revisou a importância das diferenças específicas e individuais na criopreservação de sêmen e concluiu que a preservação da integridade espermática durante a congelação e descongelação é claramente importante, porém que a habilidade fertilizante do sêmen congelado depende também do contexto biológico no qual é utilizado. O mesmo autor concluiu ainda, que o conhecimento das crioinjúrias e a revelação de fatores genéticos relacionados à resistência seminal à congelação podem auxiliar muito na elucidação das diferenças específicas e individuais quanto à congelabilidade, contribuindo para o desenvolvimento desta biotecnologia.

2.5 Fertilidade com Sêmen Congelado Equino

A variabilidade entre as metodologias de congelação, crioprotetores, meios diluentes, técnica e número de inseminações artificiais torna difícil a comparação entre os índices de fertilidade publicados por diversos autores. Para melhor visualização, os dados de fertilidade de diversos trabalhos nacionais e internacionais foram descritos na Tabela 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1: Índices de Fertilidade, dados nacionais

Autor(es)	Metodologia	N° de sptz	IA	Fertilidade
Arruda et al.(1986) apud Neves Neto(2004)		400 a 500x10 ⁶	Intracornual	66,7%
Papa (1987)	macrotubo	400x10 ⁶	Corpo do útero	52%
Neves Neto (1999)	Palheta 0,5 ml	800x10 ⁶	Corpo do útero	40,0% BME
	Palheta 0,5ml	800x10 ⁶	Corpo do útero	53,3% M9
Dell'aqua Jr. (2000)	Palheta 0,5 ml	150x10 ⁶	Corpo do útero	40% pré e pós
	Palheta 0,5 ml	150x10 ⁶	Ápice corno	50% pré e pós
	Palheta 0,5 ml	800x10 ⁶	Corpo do útero	20% pós
	Palheta 0,5 ml	400/400x10 ⁶	Corpo do útero	30% pré e pós
	Palheta 0,25ml	50x10 ⁶	Corpo do útero	40% pós
	Palheta 0,25ml	50x10 ⁶	Ápice cornual	0% pós
	Palheta 0,25ml	50x10 ⁶	Corpo do útero	20% pós
Gomes (2002)	Palheta 0,5 ml	40x10 ⁶	Corpo do útero	30%
	Palheta 0,5 ml	40x10 ⁶	Endoscopia	66,6%
Leão (2002)	Palheta 0,5 ml	400x10 ⁶	Corpo do útero	0%
	Palheta 0,5 ml	10x10 ⁶	Endoscopia	33,3%
Zahn (2002)	Palheta 0,5 ml	400x10 ⁶	Corpo do útero	75% s/ colesterol
	Palheta 0,5 ml	400x10 ⁶	Corpo do útero	25% c/ colesterol
Medeiros (2003)	Palheta 0,5 ml	800x10 ⁶	Corpo do útero	0% glicerol
	Palheta 0,5 ml	800x10 ⁶	Corpo do útero	40% DF
Neves neto (2004)	Palheta 0,5 ml	400/400x10 ⁶	Ápice cornual	45,0% BME
	Palheta 0,5 ml	400/400x10 ⁶	Ápice cornual	60,0 % MP50
	Palheta 0,5 ml	400/400x10 ⁶	Ápice corneal	40,0% FR4

*Adaptado de Melo, 2005

Tabela 2: Índices de Fertilidade, Dados internacionais

Autores	Envase	N°sptz/palheta	IA	Fertilidade
Nagase (1967)	0,3 ml	Não relatado	10-30 pellets	33%
Bader (1968)	Pellet	Não relatado	Não relatado	39%
Ellery (1971)	Sachê plástico	Não relatado	1 sachê	41%
Baczynski (1973)	Ampola	Não relatado	Não relatado	4%
Klug (1975)	Pellet	Não relatado	18-33 pellets	27%
Merkt (1975)	Pellet	Não relatado	30 pellets	60%
Tischner(1975)	2,5 ml	400-700x10 ⁶	2-4 ampolas	26%
Nishikawa (1975)	Palheta 1ml	75-125x10 ⁶	3-5 palhetas	56%
Naumenkov (1979)	0.2 ml	Não relatado	1 Pellet	53%
Martin (1979)	Palheta 4 ml	200-400x10 ⁶	1 palheta	63%
Tischner (1979)	20-25 ml	300x10 ⁶	1 tubo alum.	32%
Naumenkov (1979)	25 ml	Não relatado	1 tubo alum.	62%
Muller (1982)	15ml	Não relatado	1 tubo alum.	52%
Loomis (1983)	Palheta 0,5 ml	250x10 ⁶	1 palheta	29%
Cochran (1983)	Palheta 1ml	250x10 ⁶	1 palheta	28%
Cristanelli (1984)	Palheta 0,5 ml	385x10 ⁶	1 palheta	56%
Volkman (1987)	Palheta 0,5 ml	325x10 ⁶	1 palheta	44%
Volkman (1987)	Palheta 0,5 ml	325x10 ⁶	2 palhetas	73%
Kloppe (1988)	Palheta 4ml	600x10 ⁶	1 palheta	60%
Love (1989)	10-12 ml	1000-1200x10 ⁶	1 tubo alum.	55%
Love (1989)	Palheta 4ml	400x10 ⁶	1 palheta	46%
Braun (1990)	Pellet	Não relatado	1 Pellet	0%
Haard (1991)	Palheta 0,5 ml	500x10 ⁶	1 palheta	60%
Samper (1991)	Palheta 2,5 ml	200x10 ⁶	1 palheta	51%
Jasko (1992)	Palheta 0,5 ml	800x10 ⁶	1 palheta	56%
Thomassen (1993)	Palheta 0,5 ml	150x10 ⁶	7 palhetas	43%
Samper (1994)	Palheta 2,5 ml	200x10 ⁶	1 palheta	38%
Heitland(1995)	Palheta 0,5 ml	200x10 ⁶	4 palhetas	17% e 50%

*Adaptado de Melo 2005

3. Material e Método

3.1 Experimento I: Utilização de sistemas de refrigeração de sêmen eqüino na estabilização das amostras seminais previamente a congelação

3.1.1 Animais

Foram utilizados 4 garanhões com idades entre 5 e 20 anos, das raças Westfallen, Quarto de Milha, Puro Sangue Árabe e Hannoverano, pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Eqüina (CERBEQ) e Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP/Botucatu. Foram utilizados 9 ejaculados dos garanhões das raças Westfallen e Hannoverano, e 9 ejaculados dos garanhões das raças Quarto de Milha (QM) e Puro Sangue Árabe (PSA) totalizando 36 ejaculados. Porém, 6 amostras (3 QM, 3PSA) foram desprezadas pela dificuldade de armazenamento das palhetas no sistema Equitainer[®].

3.1.2 Colheita de Sêmen

A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial (Biotech Botucatu, SP-Brasil), composta por um tubo rígido de fibra de vidro mucosa de látex e mucosa plástica descartável, acoplada a um copo coletor isotérmico contendo uma camisa sanitária descartável, na temperatura de aproximadamente 45 °C.

3.1.3 Análises Laboratoriais

Cada ejaculado foi filtrado com auxílio de um filtro de nylon e o volume mensurado em proveta graduada. Em seguida, foi feita avaliação macroscópica quanto à cor, odor e aspecto com o objetivo de eliminar amostras que apresentassem alguma anormalidade. Uma pequena alíquota foi retirada para

avaliação dos parâmetros de motilidade total e progressiva (CASA - Anexo 1) e concentração, realizada em microscópio de luz com contraste de fase (200X), com auxílio de uma câmara de Neubauer após diluição na proporção de 1:20 (sêmen/água destilada).

3.1.4 Processamento do Sêmen

Os ejaculados foram diluídos na proporção de 1:1 com diluente Botu-Sêmen[®] (Biotech Botucatu, SP- Brasil) e centrifugados por 10 minutos a 600xg. Os “pellets” foram ressuspensos com diluente para criopreservação Botu-Crio[®] (Biotech Botucatu, SP- Brasil) na concentração de 200×10^6 espermatozóides viáveis por mL, envasados em palhetas de 0,5 mL e divididos em 3 grupos. No **Grupo M**, as palhetas foram dispostas horizontalmente em geladeira **Minitub**[®] (Minitub do Brasil) a 5°C por 20 minutos. No **Grupo B**, as palhetas foram colocadas verticalmente no sistema de transporte refrigerado de sêmen **Botutainer**[®] (Biotech Botucatu, SP- Brasil), previamente equilibrado na temperatura interna de 5°C e mantidas por 20 minutos. No **Grupo E**, as palhetas foram dispostas verticalmente no sistema **Equitainer**[®] (Hamilton Research INC., USA), também previamente equilibrado a temperatura interna de 5°C e mantidas pelos mesmos 20 minutos.

Após o período de estabilização, a congelação seguiu-se da mesma maneira para os 3 grupos. As palhetas foram colocadas horizontalmente a 6 cm acima do nível de nitrogênio líquido (N₂) em caixa de isopor de 40 litros com dimensões de 40x30x25 cm, contendo 3,5 cm de N₂ e foram mantidas em vapor de N₂ por 20 minutos e depois criopreservadas por imersão direta no mesmo.

As palhetas foram descongeladas em banho Maria a 46°C por 20 segundos (Dell'Aqua Jr., 2000) e analisadas quanto a motilidade total e progressivas (CASA),

integridade de membrana plasmática por microscopia de fluorescência através da associação das sondas Iodeto de Propídeo e Diacetato de 6-carboxifluoresceína segundo Zúccari (1998). Os constituintes das soluções estoque e da solução de trabalho estão descritos nos Anexos 2 e 3.

3.2 Experimento II: Influência de diferentes sistemas e curvas de congelação na eficiência da congelabilidade e fertilidade de sêmen eqüino.

3.2.1 Animais, Colheita do Sêmen e Análises Laboratoriais

Os animais utilizados no Experimento II foram os mesmos utilizados no Experimento I. No entanto, foram utilizados 9 ejaculados de cada um dos 4 garanhões. A metodologia de colheita do sêmen e as análises laboratoriais também foram feitas como descrito no Experimento I.

3.2.2 Processamento do Sêmen

A diluição, centrifugação, ressuspensão e envase das amostras foram feitas da mesma maneira descrita no Experimento I. Para a congelação das amostras foram utilizadas 3 diferentes curvas de congelação programadas em uma máquina automatizada (TK3000[®] - TK tecnologia em congelação, Uberaba, Brasil). O período de resfriamento a 5°C das amostras dos grupos congelados na máquina foi realizado com uma curva de 0,5°C/min. As amostras do Grupo Controle (GC) foram refrigeradas a 5°C em refrigerador programável Minitüb[®] por 20 minutos. A congelação foi realizada utilizando uma caixa de isopor de 40 litros de dimensões de 40x30x25cm, contendo 3,5 cm de nitrogênio líquido, na qual as palhetas eram dispostas a 6 cm do nível do nitrogênio por 20 minutos e congeladas por imersão direta no mesmo.

As curvas programadas na máquina foram: **Curva 1-** Curva similar a curva de congelação a 6 cm do nível do N₂ em caixa de isopor (**C1**): 15°C/min. entre +5°C e -60°C 4°C/min. entre -60°C e -100°C ; **Curva 2-** Curva de aceleração constante, na

velocidade máxima permitida pela máquina **(C2)**: 20°C/min. entre +5°C e -100°C e

Curva 3- Curva inicial na velocidade máxima permitida pela máquina, seguida de uma desaceleração baseada na que ocorre na curva da caixa de isopor quando a 6 cm do nível de N₂ **(C3)**: 20°C/min. até -60°C e posteriormente a uma curva de 10°C/min. entre -60°C e -100°C. Cada ejaculado foi dividido em duas amostras, sendo uma submetida à congelação usual **(GC)** e a outra na máquina programada com uma das 3 curvas **(C1,C2 ou C3)**. Sendo assim, as comparações dos resultados das taxas de congelação foram realizadas sempre em relação ao seu grupo controle.

Após a descongelação das palhetas, os parâmetros espermáticos foram avaliados utilizando-se o sistema computadorizado Hamilton Thorm (CASA), e integridade de membrana plasmática (IMP) por microscopia de fluorescência através da associação das sondas diacetato de 6-carboxifluoresceína e iodeto de propídeo.

As amostras de sêmen para o teste de fertilidade foram colhidas, analisadas, centrifugadas, ressuspendidas e envasadas como descrito no experimento I. Cada amostra foi dividida em dois grupos sendo o Grupo Controle (GC) congelado com a metodologia usual descrita no experimento I e o Grupo 2 em que os ejaculados foram congelados na máquina TK3000, utilizando-se a curva de número 2 (C2). Apesar de não haver diferença significativa entre as diferentes curvas automatizadas estudadas, foi escolhida a curva 2, por ser a mais rápida programada na TK3000®.

3.2.3 Teste de Fertilidade

O teste de fertilidade foi realizado no período de Janeiro a Março de 2007 nas instalações do Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ). Foram utilizados 2 ciclos (um ciclo por grupo) de 23 éguas mestiças com idades entre 5 e 15 anos, e um garanhão de fertilidade comprovada da raça Westfallen pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ) e Departamento de reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP/Botucatu.

As éguas foram monitoradas diariamente através de palpação retal e ultrassonografia. A indução da ovulação foi realizada através da administração de 1mg de deslorelina por via intramuscular no momento em que as éguas apresentavam um folículo pré-ovulatório de aproximadamente 35 mm de diâmetro.

Foram realizadas duas inseminações, uma pré-ovulação (36 horas após a indução da ovulação) e outra inseminação imediatamente após a ovulação com 400×10^6 de espermatozóides viáveis cada, no ápice do corno ipsilateral à ovulação com auxílio de uma pipeta de inseminação flexível (Minitüb® - Minitub do Brasil).

O diagnóstico de gestação foi realizado entre 12 e 15 dias após a detecção da ovulação, por meio de ultrassonografia (Falcon® Pie Medical).

3.3 Experimento III: Estudo de diferentes sistemas e curvas de congelação na eficiência da congelabilidade de garanhões da raça Mangalarga Marchador

Ao término do Experimento II, observou-se que não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, quer seja laboratorial, quer seja na fertilidade, provavelmente por terem sido utilizados garanhões de alta congelabilidade do sêmen, o que motivou a execução do Experimento III com garanhões de baixa congelabilidade do sêmen pertencentes à raça Mangalarga Marchador. No momento da realização do Experimento III foi possível utilizar dois exemplares da máquina TK3000[®], o que possibilitou o teste de novas curvas com um mesmo ejaculado.

3.3.1 Animais

Foram utilizados 8 garanhões da raça Mangalarga Marchador, sendo sete pertencentes ao Haras Ogar, situado na cidade de Lins, no estado de São Paulo e um pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ) e Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP/Botucatu. Para o experimento, utilizou-se um ejaculado de cada garanhão.

3.3.2 Colheita do Sêmen

O sêmen foi colhido da mesma maneira descrita no Experimento I.

3.3.3 Análise Laboratorial

Para os animais locados no Haras Ogar-Lins, foi realizada a análise da motilidade total do sêmen dos 7 animais de forma subjetiva com auxílio de um microscópio de luz, imediatamente após a colheita e diluição com o meio Botu-Sêmen[®] (Biotech Botucatu, SP-Brasil). A análise laboratorial do sêmen do garanhão pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP/Botucatu, foi feita da mesma maneira descrita no Experimento I.

3.3.4 Processamento do Sêmen

As amostras colhidas no Haras Ogar foram diluídas em meio diluente Botu-Sêmen[®] na proporção de 2:1 (diluente:sêmen) e armazenadas por um período de 3 hs no sistema de transporte refrigerado Botutainer[®], ou seja, tempo necessário para o transporte do Haras até o laboratório. Os ejaculados colhidos no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária foram submetidos à mesma diluição e período de refrigeração para padronização do procedimento. Após o período de refrigeração, uma alíquota de 1 mL de todas as amostras foi aquecida por 10 minutos a 36°C e então avaliadas quanto a motilidade total e progressiva pelo CASA.

A centrifugação, ressuspensão e envase foram efetuadas da mesma forma descrita no Experimento I. Após o processamento, as amostras foram então divididas em três grupos e congeladas simultaneamente:

Grupo Controle (GC): Metodologia usual de congelação em caixa de isopor descrita no experimento I.

Grupo 2: Congelação realizada através da máquina de congelação TK3000, programada com uma curva de 25°C por minuto até -120°C.

Grupo 3: Congelação realizada através da máquina de congelação TK3000, programada com uma curva de 20°C/min. entre +5°C e -60°C e 10°C/min. entre -60°C e -100°C.

Após a descongelação das palhetas (descrita no Experimento I), os parâmetros espermáticos foram avaliados pelo CASA, e a integridade de membrana plasmática (IMP) por microscopia de fluorescência através da associação das sondas diacetato de 6-carboxifluoresceína e iodeto de propídeo.

Para a análise estatística, as amostras foram divididas em dois grupos de acordo com a porcentagem de motilidade total (acima ou abaixo de 50%) com o intuito de diminuir os efeitos do alto desvio padrão encontrado quando as amostras são comparadas em apenas um grupo.

3.4 Análise Estatística

No Experimento I, para comparação dos efeitos do sistema de refrigeração na estabilização de amostras previamente a congelação na qualidade do sêmen descongelado foi feita a análise de variância (ANOVA). Nos casos em que foi verificada variação, foi utilizado o teste de Tukey para avaliar as diferenças significativas entre os grupos.

No Experimento II, a análise de variância foi feita para verificar a eficiência dos sistemas e curvas de congelação na viabilidade do sêmen descongelado. O teste de Tukey foi realizado, nos casos em que houve variação, para verificar as diferenças significativas entre os grupos e, para o teste de fertilidade, foi aplicado o teste Qui-quadrado na comparação dos índices de fertilidade.

No Experimento III, para a comparação entre os sistemas e curvas utilizadas na congelabilidade do sêmen descongelado também foi feita a análise de variância e nos casos em que houve variação, aplicou-se o teste de Mann-Whitney U-statistic.

Em todas as análises, os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Experimento I

Utilização de sistemas de refrigeração de sêmen eqüino na estabilização das amostras seminais previamente à congelação

Entre as metodologias de estabilização avaliadas não houve diferença significativa para os valores de motilidade total e motilidade progressiva. No entanto, quando avaliada a integridade de membrana plasmática, observou-se inferioridade na utilização do sistema equitainer[®] em relação aos outros sistemas estudados ($p < 0,05$), conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Médias e desvios padrão, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP) das amostras de sêmen descongeladas, submetidas ao período de estabilização prévio a congelação nos sistemas Minitüb[®], Botutainer[®] e Equitainer[®]

Sistemas			
Variáveis	Minitüb [®]	Botutainer [®]	Equitainer [®]
MT	67,16±10,34	65,60±10,63	63,46±11,45
MP	32,10±7,84	31,90±6,71	30,40±7,27
IMP	49,43±5,43 ^a	48,70±7,12 ^a	44,90±6,74 ^b

Médias seguidas de diferentes letras, na mesma linha, diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

4.2 Experimento II

Influência de diferentes sistemas e curvas de congelação na eficiência da congelabilidade e fertilidade de sêmen eqüino.

Os valores, dos parâmetros Motilidade Total, Motilidade Progressiva e Integridade de Membrana Plasmática não diferiram significativamente entre as amostras congeladas com a metodologia usual (GC) e com a curva 1 inserida na Máquina TK 3000 (C1), conforme demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4: Médias e desvios padrão, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob a curva C1 da máquina de congelação TK3000 e seu respectivo grupo controle (GC) congelado em caixa de isopor.

Curvas de Congelação		
Variáveis	GC	C1
MT	70,08±6,46	67,5±6,29
MP	35,75±8,47	32,00±9,00
IMP	48,33±5,12	46,08±5,31

Quando comparadas a metodologia usual (GC) e a máquina de congelação TK3000, programada com a curva 2 (C2), também não houve diferença significativa entre as variáveis Motilidade Total, Motilidade Progressiva e Integridade de Membrana Plasmática. Os resultados, em porcentagem, estão evidenciados na Tabela 5.

Tabela 5: Médias e desvios padrão, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob a curva C2 da máquina de congelação TK3000 e seu respectivo grupo controle (GC) congelado em caixa de isopor

Curvas de Congelação		
Variáveis	GC	C2
MT	63,00±9,05	67,67±10,74
MP	33,08±5,17	33,90±9,20
IMP	45,41±7,77	48,33±7,40

Quando utilizada a máquina TK3000 programada com a curva 3 (C3) em comparação a metodologia usual (GC), os parâmetros seminais estudados Motilidade Total, Motilidade Progressiva e Integridade de Membrana Plasmática também não diferiram significativamente, como ratificado na Tabela 6, a seguir.

Tabela 6: Médias e desvios padrão, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob a curva C3 da máquina de congelação TK3000 e seu respectivo grupo controle (GC) congelado em caixa de isopor

Curvas de Congelação		
Variáveis	GC	C3
MT	63,25±12,13	65,00±8,42
MP	31,66±7,08	32,41±3,86
IMP	48,72±6,14	50,00±5,40

4.3 Teste de Fertilidade

Os índices de prenhez encontrados quando da utilização de sêmen congelado com a metodologia usual (GC) e com a máquina TK3000 programada com a curva 2 (G2) nas inseminações artificiais não diferiram significativamente conforme demonstra a Tabela 7.

Tabela 7: Número de éguas prenhes e não prenhes e índice de prenhez obtidos através da inseminação artificial de 46 ciclos de 23 éguas utilizando sêmen congelado sob a curva C2 da máquina de congelação TK3000 e do grupo controle, congelado em caixa de isopor

Metodologia		
Éguas	GC	G2
Prenhes	14	15
Não Prenhes	9	8
Índice de Prenhez	60%	65%

4.4 EXPERIMENTO III

Estudo de diferentes sistemas e curvas de congelação na eficiência da congelabilidade de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

Quando comparadas as médias e desvios padrão da motilidade total do sêmen dos animais que apresentaram índice acima de 50% pós-descongelação, observou-se que o Grupo 2 foi significativamente superior ao Grupo Controle, no entanto não houve diferença quando comparado ao Grupo 3. Em relação à motilidade progressiva, o Grupo 2 foi significativamente superior aos demais grupos. Já, quando comparados os valores de integridade de membrana plasmática não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8: Médias e desvios padrão dos parâmetros espermáticos motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP), em porcentagem, das amostras seminais que apresentaram motilidade total acima de 50% pós-descongelação, do grupo controle “GC” (caixa de isopor) e das curvas do grupo G2 e G3 (máquinas de congelação).

Metodologia			
Variáveis	GC	G2	G3
MT	61,8±8,3 ^b	75,0±5,5 ^a	66,3±4,5 ^{ab}
MP	28,0±7,5 ^b	41,0±7,0 ^a	27,5±1,3 ^b
IMP	51,3±7,4 ^a	55,0±6,3 ^a	53,5±7,7 ^a

Médias seguidas de diferentes letras, na mesma linha, diferem estatisticamente (p<0,05)

Quando comparadas as médias e desvios padrão da motilidade total do sêmen dos animais que apresentaram índice abaixo de 50% pós-descongelação, observou-se que o Grupo 2 foi significativamente superior ao Grupo Controle, no entanto não houve diferença quando comparado ao Grupo 3. Em relação à motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados, de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9: Médias e desvios padrão dos parâmetros espermáticos motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP), em porcentagem, das amostras seminais que apresentaram motilidade total abaixo de 50% pós-descongelação, do grupo controle “GC” (caixa de isopor) e das curvas do grupo G2 e G3 (máquinas de congelação).

Metodologia			
Variáveis	GC	G2	G3
MT	13,3±2,2 ^b	20,5±3,3 ^a	19,5±5,2 ^{ab}
MP	3,8±1,5 ^a	6,8±3,0 ^a	6,0±3,2 ^a
IMP	16,8±3,9 ^a	20,8±5,4 ^a	19,5±7,0 ^a

Médias seguidas de diferentes letras, na mesma linha, diferem estatisticamente (p<0,05)

Os valores de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática dos ejaculados que apresentaram porcentagem acima e abaixo de 50% de motilidade total estão ilustrados nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 a seguir :

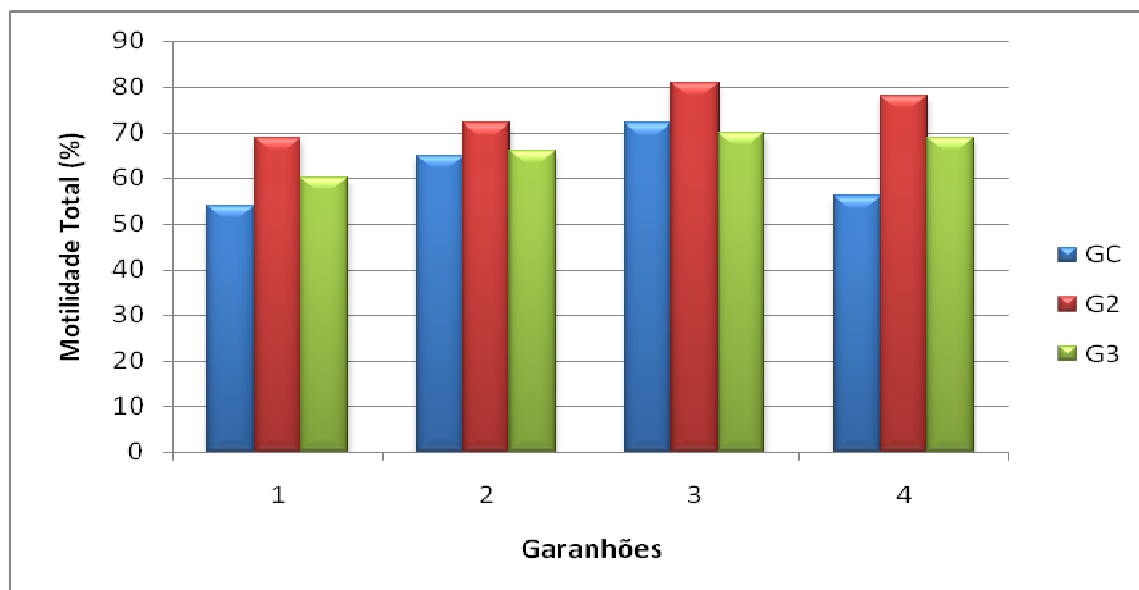


Figura 1: Avaliação computadorizada (CASA) dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais apresentaram valores acima de 50% de motilidade total pós-descongelação. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.

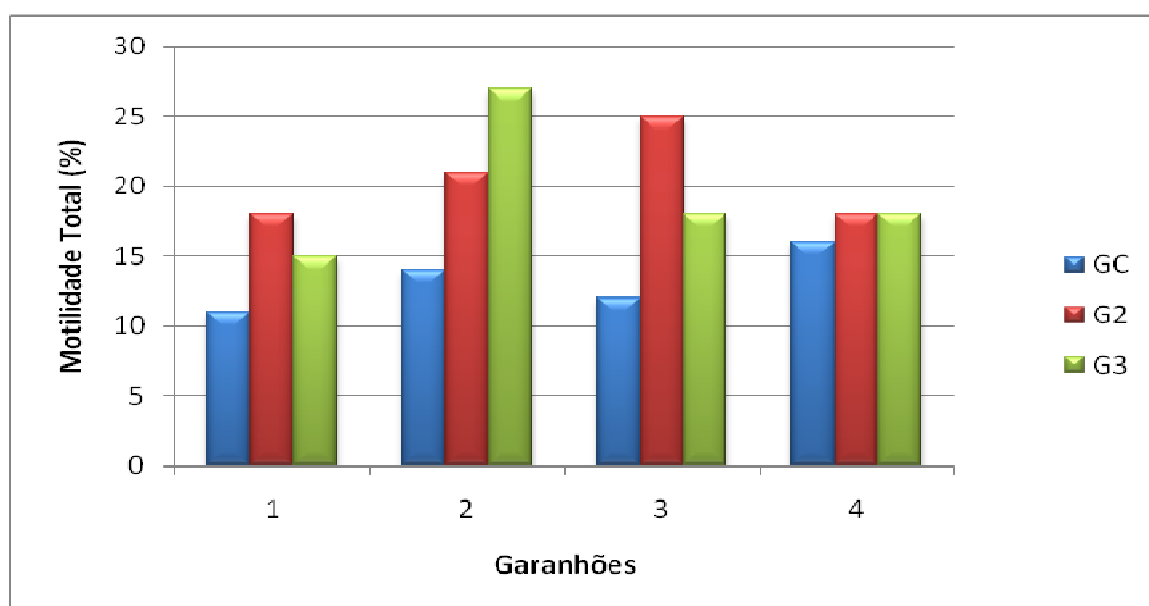


Figura 2: Avaliação computadorizada (CASA) dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais apresentaram valores abaixo de 50% de motilidade total pós-descongelação. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.

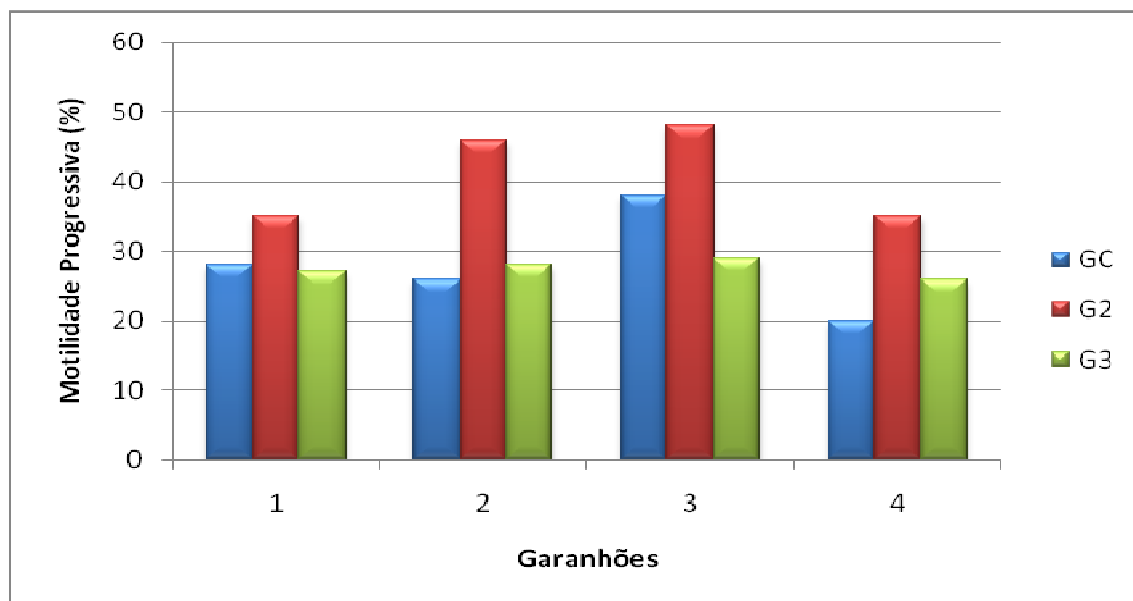


Figura 3: Avaliação computadorizada (CASA) da motilidade progressiva dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais apresentaram valores acima de 50% de motilidade total pós-descongelação. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.

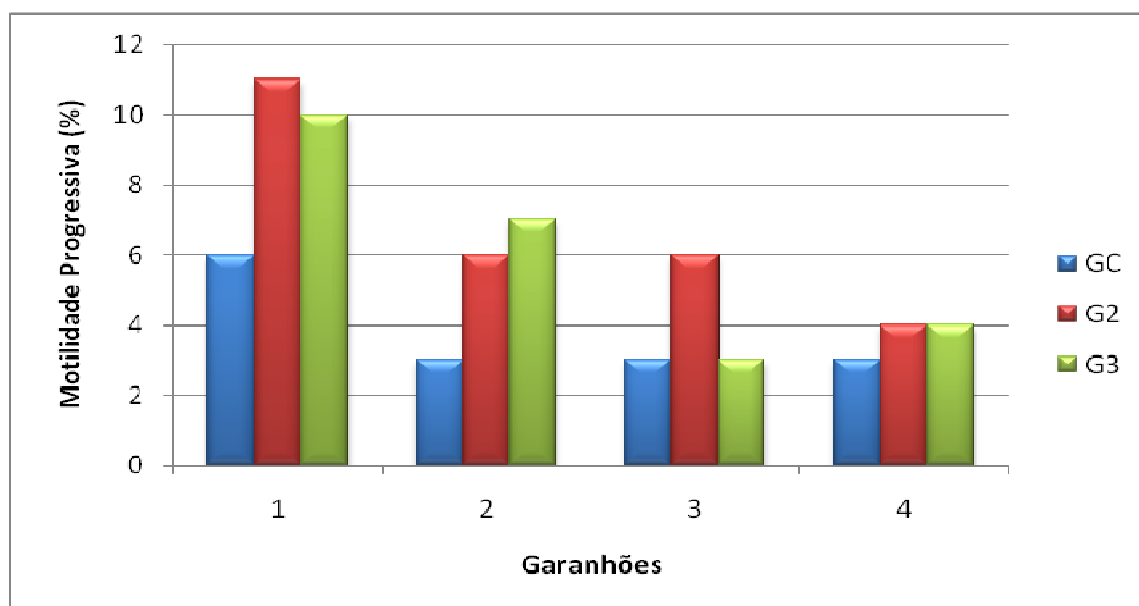


Figura 4: Avaliação computadorizada (CASA) da motilidade progressiva dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais apresentaram valores abaixo de 50% de motilidade total pós-descongelação. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.

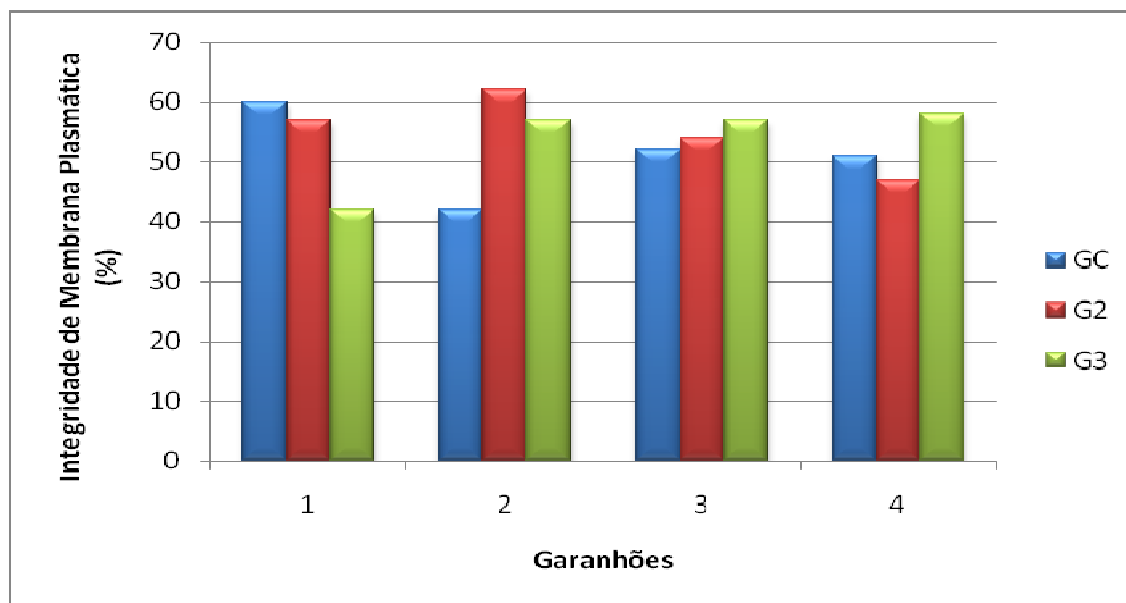


Figura 5: Avaliação computadorizada (CASA) da integridade de membrana plasmática dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador, os quais apresentaram valores abaixo de 50% de motilidade total pós-descongelção. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.

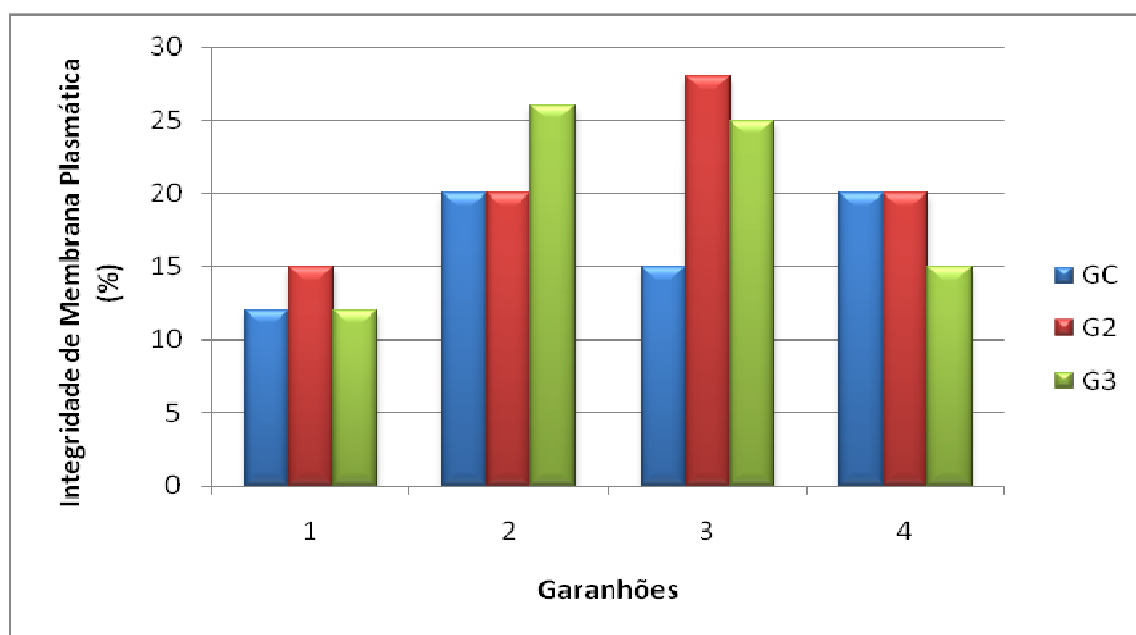


Figura 6: Avaliação computadorizada (CASA) da integridade de membrana plasmática dos ejaculados de quatro garanhões da raça Mangalarga Marchador os quais apresentaram valores abaixo de 50% de motilidade total pós-descongelção. GC: Caixa de isopor, a 6 cm do nível de nitrogênio líquido; G2: Máquina de congelação, 25°C/min de +5°C até -120°C; G3: Máquina de congelação 20°C/min de +5°C até -60°C e 10°C/min entre -60°C e -100°C.

5 Discussão

No presente estudo, foram utilizados os sistemas de transporte refrigerado de sêmen eqüino (Equitainer[®] e Botutainer[®]) para a estabilização seminal previamente a congelação, em comparação a utilização do refrigerador programável Minitüb[®]. A utilização destes sistemas pode facilitar o procedimento de congelação a campo, pois apresentam um menor custo e maior praticidade do que o refrigerador programável. Melo (2005) utilizou o sistema Minitüb[®] para o período de estabilização das amostras seminais durante 20 minutos a 5 °C e obteve resultados de motilidade total e progressiva (68,9%; 31,6%) similares ao do presente experimento (GM: 67,1%; 32,1% - GB: 65,2%; 31,9% - GE: 63,4%; 30,4%).

Os testes estatísticos utilizados demonstraram que no presente estudo não houve diferença significativa entre os valores dos parâmetros espermáticos de motilidade total e motilidade progressiva das amostras quando comparadas as diferentes formas de refrigeração. No entanto, quando avaliada a integridade de membrana plasmática, observou-se inferioridade na utilização do sistema Equitainer[®] em relação aos outros sistemas estudados ($p < 0,05$). O sistema Equitainer[®] demonstrou ser significativamente inferior ao sistema Botutainer[®] e ao refrigerador Minitüb[®] na manutenção da integridade de membrana plasmática das células espermáticas. A superioridade do sistema Minitüb[®] em relação ao Equitainer[®], neste experimento, pode ser explicada pela manutenção do controle automatizado da temperatura promovido pelo refrigerador. No entanto, Avanzi et al. (2007) compararam os sistemas Botutainer[®] e Equitainer[®] sob diferentes temperaturas simulando estresse térmico pelo frio (-4 °C), pelo calor (38 °C), além da temperatura ambiente (24 °C), diferentemente do que foi observado no presente

experimento, não foram encontradas diferenças significativas da integridade de membrana plasmática entre os sistemas testados sob diferentes temperaturas.

Apesar da manutenção da viabilidade espermática, as taxas de refrigeração utilizadas no presente estudo (3,4 °C/min. no refrigerador programável e 1,13 °C/min nos sistemas de transporte) foram diferentes das taxas recomendadas por Kayser et al (1992). Estes autores concluíram que o espermatozóide eqüino pode ser refrigerado rapidamente de 37 a 20 °C, mas deve ser refrigerado a uma taxa menor que 0,1 °C por minuto e preferencialmente a 0,05 °C por minuto, de 20 a 5 °C para manter a máxima sobrevivência espermática. Os sistemas de transporte refrigerado Equitainer® e Botutainer® apresentam taxas de refrigeração de 0,03 e 0,05 °C/min. respectivamente e são considerados adequados à biotecnologia de sêmen refrigerado.

Apesar das curvas utilizadas no presente trabalho serem mais rápidas do que as recomendadas por Kayser et al. (1992), as três metodologias testadas permitiram a obtenção de bons resultados de motilidade total (G1=67,1%, G2=65,2%, G3=63,4%), motilidade progressiva (G1=32,1%, G2=31,9%, G3=30,4%) e integridade de membrana plasmática (G1=49,4%^a, G2=48,7%^a, G3=44,9%^b), demonstrando que os três dispositivos foram eficientes na estabilização seminal prévia a congelação. Esta similaridade talvez possa ser explicada com base nos animais utilizados por apresentarem sêmen de alta congelabilidade e o meio diluente Botu-Crio®, que tem demonstrado oferecer uma maior proteção as células espermáticas durante o processo de congelação de sêmen eqüino em comparação aos diluentes mais utilizados no mundo, INRA 82 e Lactose-EDTA-gema de ovo, conforme descrito por Pasquini et al (2007).

A maior dificuldade encontrada na utilização do sistema Equitainer[®], no experimento I foi o armazenamento das palhetas em seu interior, já que a altura do recipiente interno deste sistema é menor do que a altura das palhetas de 0,5mL utilizadas, ocorrendo o dobramento de algumas amostras que tiveram que ser desprezadas. No sistema Botutainer[®], não houve dificuldade no armazenamento das palhetas visto que foi desenvolvido e adaptado a palhetas de 0,5 e 0,25 mL.

Nos Experimentos II e III foram comparadas diferentes curvas inseridas em uma máquina nacional e portátil de congelação de sêmen (TK3000[®]) em comparação a metodologia de congelação em caixa de isopor. Além de facilitar o procedimento de congelação nas propriedades rurais, as máquinas programáveis colaboram com os estudos que buscam encontrar taxas ideais de congelação seminal para as diferentes espécies. Ainda são poucos os trabalhos em relação à taxa ideal de congelação para o sêmen eqüino, o que dificulta a comparação entre os resultados.

O período de estabilização dos grupos congelados na caixa de isopor foi realizado no refrigerador Minitüb[®] (3,4 °C/min) por 20 minutos e dos grupos congelados na máquina TK3000[®] foi feito na mesma (0,5 /min) por aproximadamente 40 minutos, não sendo observadas diferenças significativas quanto aos valores de motilidade total, progressiva e integridade de membrana plasmática. Estes achados contrariam os observados por Blanes et al. (2005), que demonstraram que a motilidade total foi superior quando a estabilização foi realizada a 5 °C por 20 minutos em comparação a 60 minutos com o diluente Botucríio[®].

No presente experimento, apesar de mais lentas do que a curva ótima sugerida por Devireddy et al. (2002) (~29 sem adição de crioprotetores e ~69 °C/minuto com adição de crioprotetores), as curvas de congelação **C1**(15 °C/min.

entre +5°C e -60°C e 4°C/min. de -60°C até -100°C); **C2**(20°C/min. entre +5°C até -100°C) e **C3**(20°C/min. até -60°C e 10°C/min. entre -60°C até -100°C), programadas na máquina TK3000[®] demonstraram ser tão eficientes quanto a metodologia em caixa de isopor na manutenção da viabilidade espermática. Deve-se levar em consideração que os resultados de Devireddy et al. (2002) foram obtidos através da avaliação da permeabilidade da membrana espermática à água durante a congelamento em diferentes taxas, feita através de um equipamento termoanalítico e que o glicerol foi o crioprotetor utilizado, sendo que as taxas poderiam variar se as amidas fossem utilizadas.

A semelhança entre os resultados das diferentes curvas testadas em relação ao controle na caixa de isopor, no presente experimento, provavelmente pode ser explicada pela utilização de garanhões que apresentam sêmen de alta congelabilidade. Esses achados corroboram com os descritos por Papa et al. (2003), que não observaram diferenças na motilidade e integridade de membrana pós descongelamento de espermatozoides eqüinos congelados a diferentes alturas do nitrogênio líquido (1,3,6 e 9 cm) e com os achados de Clulow et al. (2007) que ao comparar uma mesma curva executada na máquina Planer Kryo[®] e na caixa de isopor Styrofoam[®] (50°C/min. por um minuto, seguida de 10°C/min. por seis minutos e aumentando gradativamente até 50°C/min. até que a temperatura das amostras atingissem 110°C, esta taxa foi mantida até que temperatura das palhetas alcançasse 150°C) observaram que não houve diferença significativa entre os parâmetros de motilidade total e integridade acrossomal (eosina-nigrosina). Devireddy et al. (2002), também observaram que o percentual de membrana plasmática íntegra não diferiu significativamente quando utilizadas as curvas de 20, 50, 70 e 130°C/min nas amostras com crioprotetor.

A eficiência na manutenção da viabilidade espermática observada no presente experimento, mesmo tendo utilizado curvas mais lentas do que as sugeridas por Devirredy et al. (2002) e Clulow et al. (2007), pode ser explicada pela utilização de taxas moderadas e não lentas de congelação. As taxas moderadas não expõem as células por um período muito longo à fase de liberação de calor latente de fusão que ocorre na fase de formação de cristais de gelo (-10°C). Este fato também pode ser atribuído à ação do diluente Botu-Crio[®] que conforme os resultados encontrados por Pasquini et al. (2007) ofereceu maior proteção as células espermáticas durante a congelação em comparação aos diluentes mais utilizados no mundo INRA 82 e Lactose-EDTA-gema de ovo. A utilização de animais com sêmen de alta congelabilidade também podem ter contribuído na observação destes resultados.

Para o teste de fertilidade a curva de congelação escolhida para ser utilizada foi a C2 ($20^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) por ser a mais rápida entre as curvas programadas na TK3000[®] e portanto mais prática. A análise estatística dos dados demonstrou não haver diferença entre os índices de prenhez obtidos com o sêmen congelado através da máquina TK3000 (65%) e com a metodologia usual em caixa de isopor (60%), demonstrando que as duas metodologias foram eficientes.

Os trabalhos que buscam taxas ideais de congelação de sêmen eqüino encontrados na literatura não realizaram o teste de fertilidade ou não oferecem dados sobre o mesmo. Porém, os obtidos neste experimento foram iguais ou superiores aos índices de fertilidade encontrados em diversos estudos desenvolvidos no Brasil e no exterior que foram apresentados na Tabela 1 e 2, apesar dos mesmos não terem utilizado máquinas de congelação.

A raça Mangalarga Marchador foi escolhida e utilizada no Experimento III, visto que a mesma apresenta uma menor resistência ao processo de congelação e descongelação quando comparada a diversas raças, entre elas podemos destacar as germânicas e a Quarto de Milha que foram utilizadas no Experimento II. Esta resistência menor a congelabilidade já havia sido observada por Alvarenga et al. (1992) e Alvarenga (2002) apesar dos autores terem utilizado diluidores diferentes dos atuais.

No entanto, experimentos que testaram diferentes taxas e curvas de congelação na espécie eqüina sempre usaram garanhões de boa ou alta congelabilidade resultando em semelhanças nos dados de motilidade total observados por Clulow et al. (2007), bem como os obtidos por Devireddy et al. (2002) que trabalharam com permeabilidade de membrana à água.

A curva C1 (15°C/min entre +5 e -60°C e 4°C/min entre -60 e -100°C), utilizada no Experimento II, simulava a curva realizada pela congelação na caixa de isopor e neste experimento optou-se por não usá-la, mantendo apenas a congelação na caixa de isopor como metodologia controle (GC). A partir deste momento utilizou-se a curva mais rápida programada no segundo exemplar da máquina, G2 (25°C/min.) e a curva intermediária entre as programadas na máquina TK3000® utilizada no Experimento II, C3 (20°C/min. até -60°C e 10°C/min entre -60 e -100°C) que neste experimento foi renomeada como G3.

Os oito garanhões considerados como animais de baixa resistência seminal à congelação apresentaram grande variação entre seus resultados de motilidade total e motilidade progressiva (Anexo 4, Tabela 14) demonstrando existir variações mesmo entre indivíduos de uma mesma raça em relação à resistência seminal à congelação como descrito por Alvarenga (2002). Para que o alto desvio padrão não

exercesse influência na análise estatística, estes ejaculados foram divididos em dois grupos de acordo com a motilidade total pós-descongelação (acima ou abaixo de 50%) e analisados separadamente.

Quando comparadas as médias e desvios padrão da motilidade total do sêmen dos animais que apresentaram índice acima de 50% pós-descongelação, observou-se que o Grupo 2 (75,0%) foi significativamente superior ao Grupo Controle (61,8%), no entanto não houve diferença quando comparado ao Grupo 3 (66,3%). Em relação à motilidade progressiva, o Grupo 2 (41,0%) foi significativamente superior aos demais grupos (GC: 28,0% e G3: 27,5%). Quando comparados os valores de integridade de membrana plasmática não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (GC: 51,3%; G2: 55,0% e G3: 53,5%). Já, quando comparadas as médias e desvios padrão da motilidade total do sêmen dos animais que apresentaram índice abaixo de 50% pós-descongelação, observou-se que o Grupo 2 (20,5%) foi significativamente superior ao Grupo Controle (13,3%), no entanto não houve diferença quando comparado ao Grupo 3 (19,5%). Em relação à motilidade progressiva (GC: 3,8%; G2: 6,8% e G3: 6,0%) e integridade de membrana plasmática (GC: 16,8%; G2: 20,8% e G3: 19,5%), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados.

Como era esperado, a utilização de animais de baixa resistência seminal à congelação evidenciou uma tendência de melhores resultados em relação à manutenção da viabilidade do sêmen quando da utilização de curvas de congelação mais rápidas para animais considerados “poor freezers”, que conforme achados de Medeiros et al. (2007), demonstram ter uma menor eficiência na regulação do equilíbrio osmótico celular. Estes resultados corroboram com os de Thurston et al. (2003) que demonstraram que a curva de congelação mais rápida (40°C/min) foi

superior à curva mais lenta (6°C/min) na eficiência da congelação de sêmen suíno, por manter a curva de congelação mais homogenia.

A utilização de um crioprotetor do grupo das amidas no meio diluente Botu-Crio[®] (dimetilformamida) também contribuiu para melhores resultados na manutenção da viabilidade espermática de animais de baixa resistência seminal à congelação, por apresentarem um menor peso molecular e serem mais permeáveis ao espermatozóide acarretam menores injúrias principalmente às células espermáticas de animais com menor eficiência na regulação do equilíbrio osmótico durante à congelação, corroborando com os achados de Medeiros et al. (2007) que observaram melhores índices de fertilidade quando utilizaram sêmen congelado contendo amidas em relação ao glicerol (dimetilacetamida 56%, metilformamida 62%, dimetilformamida 52% e glicerol 30%).

6 Conclusões

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que se realizou o presente trabalho foi possível concluir que:

- Os sistemas de transporte refrigerado de sêmen eqüino Botutainer[®] e Equitainer[®] são tão eficientes quanto o refrigerador programável Minitüb[®] no período de estabilização seminal prévio à congelação, facilitando o procedimento de congelação de sêmen a campo;
- Todas as curvas testadas no Experimento II foram eficientes na congelabilidade de sêmen eqüino em relação aos parâmetros espermáticos estudados;
- A máquina de congelação TK3000[®] foi tão eficaz quanto à metodologia de congelação em caixa de isopor.
- Com relação à fertilidade, tanto a congelação automatizada como a realizada na caixa de isopor foram eficazes;
- A curva mais rápida da máquina TK3000[®] demonstrou ser mais eficaz na congelabilidade do sêmen de animais da raça Mangalarga Marchador considerados “poor freezers”.

7 Considerações Finais

A análise dos dados do Experimento II demonstrou não haver diferença significativa entre as curvas utilizadas, hipotetizando que utilizar amostras de sêmen de alta congelabilidade pode ter mascarado os eventuais efeitos que as diferentes curvas poderiam causar sobre as células espermáticas. Isso nos levou a acreditar que estas diferenças poderiam ser evidenciadas, com a utilização de amostras seminais de baixa congelabilidade, razão pela qual foi programado e executado o Experimento III.

O Experimento II evidenciou que curvas mais rápidas permitem melhores resultados na congelação de sêmen de animais com baixa resitência seminal à congelação, no entanto as máquinas nacionais, até o presente momento, não oferecem curvas de congelação superiores a 25 °C/minuto.

Portanto, novos estudos devem ser realizados em relação às curvas ideais à congelação do sêmen eqüino utilizando-se sistemas automatizados que ofereçam curvas de congelação mais rápidas e animais com baixa resistência ao processo a criopreservação, na tentativa de evidenciar a hipótese de que o sistema automatizado possa desenvolver uma curva ideal e com isso melhorar os resultados, principalmente nos garanhões de baixa congelabilidade denominados na literatura internacional de “poor freezers”.

8 Referências Bibliográficas

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JUNIOR, J. Influência da raça e parâmetros espermáticos sobre a congelabilidade de sêmen de garanhões. In: IV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 1992, Araçatuba. **Anais...**Araçatuba: CBMV, 1992, p.94.

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

ALVARENGA, M.A.; GRAHAM, J.K.; KEITH S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SQUIRES, E.L. Alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: 11TH INTERNATIONAL CONFERENCE OF ANIMAL REPRODUCTION, **Proceedings...** 2000b, p.73

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

AMANN, R.P.; Cristanelli, M.J.; Squires, E.L. Proteins in stallion seminal plasma. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 35, p. 105-12. 1987.

AMANN, D.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: Mc KINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745, 1992.

AMANN, R.P.; PICKETT, W.B. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation stallion spermatozoa. **Equine Vet. Scie.**, v.7, p.145-1173, 1987.

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

AVANZI, B.R. PAPA, F.O.; RAMOS, S.A.; FARRAS, M.C.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA JR., J.A.; MEDEIROS, A.S.L. Avaliação de diferentes sistemas de transporte de sêmen eqüino refrigerado na manutenção da viabilidade espermática. **Acta Scien. Vet. Supl.** 3, V. 35, p.1310, 2007.

AX, R.L.; DALLY, M.R.; DIDION, B.A.; LENZ, R.W.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M.E. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Manole, 2004. p. 369 – 379.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potencial. **J. Andrology**. V. 22, p. 1061-1069. 2001.

BAUDOT, A.; AMANN, R.P.; BOWEN, R.A.; FRANTZ, D. Thermal study of simple amino-alcohol solution, **Cryobiology**, v.44, p.150-160, 2002.

BACKMAN, T.; BRUEMMER, J.E.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. **J. Anim. Sci.** v.82. p.690–694. 2004.

BIELANSKI, W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. **J. Reprod. Fertil.**, suppl. V.23, p.19-24, 1975.

BLACH, E.L. AMANN, R.P.; BOWEN, R.A.; FRANTZ, D. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. **Theriogenology** v. 31, p. 283-298.1989.

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

CELEGGHINE, 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.** Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2005. 186 p.

CLULOW, J.R.; MANSFIELD, L.J.; MORRIS, L.H.L.; EVANS G., MAXWELL, W.M.C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Anim. Reprod. Scie.** In press...2007.

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

COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. **Reprod. Domest. Anim.** V.38, p. 305-11, 2003.

CROCKETT, E.C.; GRAHAM, J.K.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Effect of cooling equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. **Theriogenology**. V.57, p. 793-803, 2001.

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

DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A.; WHITE, I.G. The effect of cold-shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. **Aust. J. Biol. Reprod.** v.26. p. 1409-1420, 1973.

DELL'AQUA Jr., J. A. **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade**

relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado eqüino. 2000. 81f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DEVIREDDY, R.V. Cryopreservation of equine spermatozoa: optimal cooling rates in the presence and absence of crioprotective agents determined using differential scanning calorimetry. v.66. p.222-231. **Biol. Reprod.** 2002.

DOWSETT, K.F.; PATTIE, W.A. Characteristics and fertility of stallion semen. **J. Reprod. Fert.**, suppl 32, 1-8. 1982.

FERREIRA, H.N., et al. Uso de diferentes concentrações de Glicerol e Metilformamida na criopreservação de sêmen de garanhões. **Acta Scien. Vet.** Supl. 3, V. 35, p. 1005, 2007.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5ml straws. **Mol. Reprod. Dev.**, v.25 (2), p.123-9, 1990.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; MAFILLI, V.V.; PROSPERI, C.P.; LIMA NETO, A. Efeito do resfriamento na criopreservação do sêmen eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.27, n.3, 2003, p. 348.

GARNER, D.L., JOHNSON, L.A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBER-14 and propidium iodide. **Biol. Reprod.** 1995; 53:276-84.

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

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Vet. Clin. of North Am.: Equine Pract.**, v.12, n.1, 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. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. **Cryobiology**. v.29, p.26-38, 1992.

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 Vet J.**, 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. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Vet.**, v.10, n.2, p.156-165, 1994

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. 1241-52, 1992.

KATILA, T. In vitro evaluation of frozen-thawed Stallion Semen: a review. **Acta. Vet. Sacand.** V.42, p. 199-217, 2001.

KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, E.L.; JASKO, D.L.; PICKETT, B.W.. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601-614, 1992.

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

KENNEY, R.M. Manual for breeding soundness examination of stallions. **Theriogenology**, v.9, p. 327-36, 1983.

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

LOOMIS, P.R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS ANNUAL CONVENTION, 38Th, 1992. **Proceedings...**p.629-47, 1992.

LOOMIS, P.R.; AMANN, R.P., SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg-yolk and package in straws. **J. Anim. Sci.** v.56. p. 687-693, 1983.

LOOMIS, R.P.; CLARCK, J.S. motion characteristics of frozen-thawed equine spermatozoa packed in 0,5mL strws at various concentrations. **Society for Theriogenology. Proceedings...** Baltimore, p. 142. 1998.

MAGISTRINI, M.; GUITTON, E.; LEVERN, Y. NICOLLE, J.C.; VIDAMENT, M.; KERCOUEF, D.; PALMER, E. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. **Theriogenology**, 1997, 48, 1229-1235.

MARTIN, J.C.; KLUG, W.; GÜNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **J. Reprod. Fert.**, v.27(Suppl), p. 47-51, 1979.

MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the deth of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology** 1977; 14: 251-72. Avaliação do Sêmen. In: Reprodução Animal.

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 Scien. Vet.** Supl. 3, V. 35, p. 1006, 2007.

MEDRANO, A.; ANDERSON, J.D., MILLAR, W.V.; HOLT, P.F. Validation of a custom-built controlled-rate freezer for small simple cryopreservation studies, **Cryo-Letters**. N. 23. P. 397-406. 2002.

MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; ZANH, F.S.; MARTIN, I.; FELÍCIO,G.B.; DELL'ÁQUA JR, J.A.;PAPA, F.O. Comparação entre dois sistemas de transporte na viabilidade de sêmen equino refrigerado por 24 horas antes da congelação. **Acta Scien. Vet.** Supl.1, V. 34, 2006.

MELO, C.M. **Efeito do armazenamento por 24 horas em diferentes sistemas de refrigeração sobre a viabilidade e fertilidade de sêmen congelado eqüino.**

Botucatu, 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

MERKT, H.; KLUG, E.; KRAUSE, D.; BADER, H. Results of long term storage of stallion semen frozen by the pellet method. **J. Reprod. Fertil.** Suppl.23, p.105-106. 1975.

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volumen sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides eqüinos criopreservados.** Pirasununga, 2006. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo.

NAGASE, H. SOEJIMA, S.; NIWA, T.; OSHIDA, H.; SAGARA, Y.; ISHIZAKI, N. HOSHO, S. Studies on the freezing of stallion semen I. Fertility results of stallion semen in concentrated pellet form. **Jpn. J. An. Reprod.**, v.12, p. 48-51, 1966.

NEVES NETO, J.R. **Avaliação morfo-funcional e fertilidade de sêmen congelado eqüino utilizando diferentes diluentes e substâncias crioprotetoras.** 2004. 102f. Tese (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu.

OETTL, E.E. Using a new acrossome stain to evaluate sperm morphology. **Vet. Med.** 1986, 81, 263-66.

PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Automated analysis of stallion semen post-thaw motility. **Acta vet. Scand.**, 1992, suppl 88, 137-52.

PALMER, F. Factors affecting stallion sperm survival and Fertility. In: 10th INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION. 1984, **Proceedings**. Urbana: 1994. p. 377.

PAPA, F.O., **Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de eqüinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial.** Botucatu, 1987. 150 p. Tese (livre docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Inseminação Artificial com sêmen a fresco. **Rev. do Cavalo Mangalarga**, v.12, p.16-23, 1987.

PAPA, F.O.; DELL'AQUA JR., J.A. Efeito do tipo de envasamento e método de descongelamento sobre parâmetros espermáticos e índices de fertilidade de sêmen congelado eqüino. **Ver. Bras. De Reprod.** v.25, n. 3, 2001.

PAPA, F.O. NEVES NETO, J.R.; FERREIRA, J.C.P.; ALVARENGA, M.A.; LEME, D.P. A comparative study between freezability and fertility stallion semen using different extenders. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. **Proceedings**...Baltimore, 1998, p. 155.

PAPA, F.O.; SANTOS, T.B.; MACEDO, L.P.; DELL'AQUA JR, J.A.; MELO, C.M.; MARTIN, I. Influência da distância entre o nível de nitrogênio líquido e as palhetas de sêmen durante o processo de congelamento sobre os parâmetros espermáticos de sêmen eqüino. **Ver. Bras. Reprod. Anim.** v.27, n.3, p. 386-70. 2003.

PAPA, F.O.; TAVARES, C.V.N.; MEIRA, C. Glicina-Gema: proposta de um novo diluidor para congelamento de sêmen eqüino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, 1993, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993. v.2, p. 326, 1993.

PAPA F.O.; ZANH, F.S.; DELL'AQUA JR., J.A. ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP-50 para criopreservação de sêmen eqüino. **Rev. Bras. de Reprod. An.**, v. 26, n.3, p.184-187, 2002.

PASQUINI, D.F.; FERREIRA, H.N.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JR. J.A.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Resultados preliminares dos parâmetros espermáticos de sêmen eqüino congelado com três dos diluentes mais utilizados no mundo. **Acta Scien. Vet. Supl. 3**, V. 35, p.1007, 2007.

PICKETT, B. W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: McKINNOM, A.D.; VOSS, S.L. **Equine Reproduction**. Malvern: Lea & Febiger. p. 769 – 789. 1993.

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W.; PACE, M.M.; REMMENG, E.E. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertil. Steril.** n.26, p. 167-74, 1975.

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 congelamento de sêmen eqüino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, 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. **J. Reprod. Fert.** 1991, Suppl 44, 107-14.

SQUIRES, E.L. Preservation of stallion semen. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 33th, 1987. **Proceedings...** p. 475-86. 1987.

SQUIRES, E.L.; BRUBAKER, J.K.; McCUE, P.M., PICKETT, B.W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. **Theriogenology**, v.28, p.709-718, 1998.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W., GRAHAM, J.K. VANDERWALL, D.K., McCUE, P.M.; BRUMMER, JE. **Cooled and frozen stallion semen**. Colorado: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, 1999. (Bulletin 9).

THURSTON, L.M.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. **Theriogenology** v.60 (1) p.101-113, 2003.

THURSTON, L.M.; SIGGINS, K.; MILEHAM, A.J.; WATSON, P.F., HOLT, W.V. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism marker linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. **Biol. Reprod.** V.66. p.545-554. 2002.

THURSTON, L.M.; WATSON, P.F.; MILEHAM, A.J.; HOLT, W.V. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **Biol. Reprod.** V.66,. p.384-394. 2001.

VARNER, D.D. Use of a computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. **Am. J. Vet. Res.** 1991, 52, 224-30.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.29, p.1043-1054, 1988.

VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Anim. Reprod. Scie.** v. 89. P. 115-135. 2005.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22⁰C instead of 4⁰C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**. v.54, p.907-19, 2000.

VIEIRA, R.C.; DUARTE, M.B. Fertilidade de sêmen eqüino congelado em palhetas de 0,5 mL, e rediluído em E-Z mixin. In: X congresso Brasileiro de Reprodução Animal, **Anais...**v.2 , p.261, 1993.

VOSS, J.L. et al. Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.178, p. 287-9, 1981.

WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. In: FINN, C. A. **Oxford reviews of reproductive biology**. New York: Oxford University Press. v.1, p.283-330, 1979.

WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreservation semen. **Anim. Reprod. Sci.** v. 60. P. 481-492. 2000.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Celular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **Intern. J. of Refrig.**, v.24, p. 438-50, 2001.

YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A.; LEIBO, S.P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. **Cryobiology** v.44 p.62-78, 2002.

ZAHN, F.S. **Efeito da incorporação de colesterol na membrana plasmática de espermatozoides sobre os parâmetros espermáticos e índice de fertilidade do sêmen congelado na espécie eqüina**. Botucatu, 2002. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

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

9 Trabalhos Científicos

Enviado à revista “Ciência Animal Brasileira”.

Utilização de sistemas de refrigeração de sêmen eqüino na estabilização das amostras seminais previamente à congelação

Use of equine cooled semen transport systems for sperm samples stabilization before freezing

Bruna De Vita¹; Gabriel Barcellos Felício¹; Cely Marini Melo¹; José Antônio Dell’Aqua Jr.¹; Frederico Ozanam Papa¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Jr., s/n. CEP: 18.618-000 – Botucatu, SP – Brasil.

bruddev@gmail.com

RESUMO

1 Este estudo objetivou analisar a viabilidade da utilização de sistemas de transporte de
2 sêmen refrigerado na estabilização das palhetas previamente a congelação. Os ejaculados
3 foram diluídos em meio diluente Botu-Sêmen[®], centrifugados por 10 minutos a 600xg e os
4 pellets ressuspensos no diluente para criopreservação Botucrio[®], envasados em palhetas de
5 0,5 ml e divididos em três grupos. No **Grupo M**, as palhetas foram dispostas horizontalmente
6 em geladeira Minitub[®] a 5°C por 20 minutos. Nos **Grupos B e E**, as palhetas foram colocadas
7 respectivamente nos sistemas Botutainer[®] e Equitainer[®], previamente equilibrados na
8 temperatura interna de 5°C e mantidas nestes sistemas também por 20 minutos. A congelação
9 seguiu-se da mesma maneira para os 3 grupos. As palhetas foram descongeladas em banho
10 maria a 46°C por 20 segundos e analisadas quanto à motilidade total (MT) e progressiva (MP)
11 (CASA), e integridade de membrana por microscopia de fluorescência (IMP). Não foram
12 observadas diferenças estatísticas ($P>0,05$) para os valores de MT (**G1=67,1%^a; G2=65,2%^a e**
13 **G3= 63,4%^a**) e MP (**G1=32,1%^a; G2=31,9%^a e G3=30,4%^a**). Para os valores de IMP não

14 foram observadas diferenças estatísticas entre os **Grupos 1** e **2**, no entanto o **Grupo 3**
15 apresentou um valor significativamente inferior ($P < 0,05$) em comparação aos outros grupos
16 (**G1=49,4%^a**, **G2= 48,7%^a**, **G3= 44,9%^b**). Os resultados demonstraram que os dispositivos
17 de transporte refrigerado de sêmen podem ser empregados na estabilização das amostras
18 seminais previamente à congelação como uma alternativa aos refrigeradores, facilitando o
19 procedimento de criopreservação a campo.

20 Palavras-chave: equino, sêmen, estabilização, criopreservação.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficiency of the cooled semen transport systems for equine sperm samples before freezing. The samples were diluted in Botu-Sêmen[®] extender and centrifuged at 600xg for 10 minutes. Then, pellets were resuspended with Botucio[®] cryopreservation extender, loaded into 0.5 mL straws and divided in three groups. On Group M, straws were placed horizontally in a refrigerator Minitub[®] at 5°C for 20 minutes. For groups B and E, the straws were placed in Botutainer[®] and Equitainer[®] systems, respectively. Both systems were previously equilibrated for an internal temperature of 5°C and straws were maintained inside then during 20 minutes. After the stabilization period, the same freezing process was performed for all groups. The straws were thawed at 46°C for 20 seconds. Sperm samples were evaluated for Total Motility (TM) and Progressive Motility (PM) (CASA) and Membrane Integrity (MPI) using fluorescent microscopy. Statistical differences were not observed ($p>0.05$) for Total Motility (**G1=67.1% ; G2=65.2% e G3= 63.4%**) and Progressive Motility (**G1=32.1% ; G2=31.9% e G3=30.4%**) values obtained in all groups. Although MPI percentages were not different between groups 1 and 2, group 3 showed a decrease when compared to the other groups (**G1=49.4%, G2= 48.7%, G3= 44.9%**). These results demonstrate that cooled semen transport systems can be used for stabilization of equine sperm samples before freezing, being an alternative for replacing refrigerators.

Keywords: equine, semen, stabilization, cryopreservation.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biotecnologias cada vez mais modernas tem contribuído para os avanços na área de Reprodução Animal. A criopreservação de sêmen se destaca por suas inúmeras vantagens: diminuição de custos com aquisição de animais geneticamente superiores; armazenamento por tempo indeterminado; utilização do sêmen de animais excepcionais mesmo após a perda da capacidade reprodutiva ou morte; racionalização do uso do reprodutor com aumento da relação macho/fêmea; controle de doenças venéreas e facilidade no transporte a longas distâncias.

Alguns protocolos incluem um período de resfriamento do sêmen antes da congelação com o objetivo de recuperar as células espermáticas dos efeitos da centrifugação e diminuir as injúrias que podem ter sido causadas pelo choque frio (Jasko, 1994). A ocorrência do choque pelo frio pode ser evitada ou amenizada refrigerando-se lentamente o sêmen equino diluído até 4°C, a taxas iguais ou inferiores a 0,05°C/min (Pickett & Amann, 1993).

O termo choque frio define algumas modificações que ocorrem no espermatozóide quando submetido a uma curva de refrigeração rápida (Jasko, 1994). Esse processo se caracteriza por padrão anormal de movimento espermático, perda rápida de motilidade, danos no acrossoma e membrana plasmática, redução do metabolismo e perda dos componentes intracelulares (Amann & Graham, 1992).

Squires et al. (1999) relataram que os componentes da membrana plasmática (lipídeos e proteínas) se movimentam lateralmente dentro da cabeça, acrossoma, e “colo” do espermatozóide. Esse estado normal da membrana é chamado estado líquido cristalino. A refrigeração altera a orientação dos lipídeos afetando a estabilidade da membrana ou induzindo a um desarranjo das moléculas, com formação de pontos de fragilidade que levam a uma permeabilidade excessiva ou mesmo à ruptura da membrana (Amann & Graham, 1992).

As injúrias causadas por essas alterações na célula durante a refrigeração podem acontecer de forma direta afetando as estruturas celulares, pela ruptura da membrana e conseqüentes modificações bioquímicas e metabólicas que são imediatamente evidentes pela alteração na motilidade, ou de forma indireta, pela alteração das funções celulares, como diminuição dos processos metabólicos (Kayser et al., 1992; Squires et al., 1999).

A despeito da conhecida sensibilidade do espermatozóide equino ao choque pelo frio, alguns estudos foram desenvolvidos com o intuito de avaliar a possibilidade de se congelar sêmen de garanhões sem refrigeração prévia. Em dois estudos, um realizado por Vidament (2000) em que se utilizou o diluente INRA 82 e outro em que o sêmen foi congelado por Fürst et al. (2003) em meio à base de lactose-EDTA-gema de ovo, houve queda significativa na motilidade pós-descongelação quando não se realizou a refrigeração antes da congelação em ambos os trabalhos.

No presente estudo, foram utilizados os sistemas de transporte refrigerado de sêmen eqüino (Equitainer[®] e Botutainer[®]) para a estabilização seminal previamente a congelação, em comparação a utilização do refrigerador programável Minitüb[®]. A utilização destes sistemas pode facilitar o procedimento de congelação a campo, pois apresentam um menor custo e maior praticidade do que o refrigerador programável.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 4 garanhões com idades entre 5 e 20 anos, das raças Westfallen, Quarto de Milha, Puro Sangue Árabe e Hannoverano, pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Eqüina (CERBEQ) e Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP/Botucatu. Foram utilizados 9 ejaculados dos garanhões das raças Westfallen e Hannoverano, e 9 ejaculados dos garanhões das raças Quarto de Milha (QM) e Puro Sangue Árabe (PSA) totalizando 36 ejaculados. Porém, 6 amostras (3 QM, 3PSA) foram desprezadas pela dificuldade de armazenamento das palhetas no sistema Equitainer[®].

Colheita de Sêmen

A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial (Biotech Botucatu, SP-Brasil), composta por um tubo rígido de fibra de vidro mucosa de látex e mucosa plástica descartável, acoplada a um copo coletor isotérmico contendo uma camisa sanitária descartável, na temperatura de aproximadamente 45°C.

Análises Laboratoriais

Cada ejaculado foi filtrado com auxílio de um filtro de nylon e o volume mensurado em proveta graduada. Em seguida, foi feita avaliação macroscópica quanto à cor, odor e aspecto com o objetivo de eliminar amostras que apresentassem alguma anormalidade. Uma pequena alíquota foi retirada para avaliação dos parâmetros de motilidade total e progressiva (CASA) e concentração, realizada em microscópio de luz com contraste de fase (200X), com auxílio de uma câmara de Neubauer após diluição na proporção de 1:20 (sêmen/água destilada).

Processamento do Sêmen

Os ejaculados foram diluídos na proporção de 1:1 com diluente Botu-Sêmen[®] (Biotech Botucatu, SP- Brasil) e centrifugados por 10 minutos a 600xg. Os “pellets” foram ressuspensos com diluente para criopreservação Botu-Crio[®] (Biotech Botucatu, SP- Brasil) na concentração de 200×10^6 espermatozoides viáveis por mL, envasados em palhetas de 0,5 mL e divididos em 3 grupos. No **Grupo M**, as palhetas foram dispostas horizontalmente em geladeira **Minitub**[®] (Minitub do Brasil) a 5°C por 20 minutos. No **Grupo B**, as palhetas foram colocadas verticalmente no sistema de transporte refrigerado de sêmen **Botutainer**[®] (Biotech Botucatu, SP- Brasil), previamente equilibrado na temperatura interna de 5°C e mantidas por 20 minutos. No **Grupo E**, as palhetas foram dispostas verticalmente no sistema **Equitainer**[®] (Hamilton Research INC., USA), também previamente equilibrado a temperatura interna de 5°C e mantidas pelos mesmos 20 minutos.

Após o período de estabilização, a congelação seguiu-se da mesma maneira para os 3 grupos. As palhetas foram colocadas horizontalmente a 6 cm acima do nível de nitrogênio líquido (N₂) em caixa de isopor de 40 litros com dimensões de 40x30x25 cm, contendo 3,5 cm de N₂ e foram mantidas em vapor de N₂ por 20 minutos e depois criopreservadas por imersão direta no mesmo.

As palhetas foram descongeladas em banho Maria a 46°C por 20 segundos (Dell’Aqua Jr., 2000) e analisadas quanto a motilidade total e progressivas (CASA), integridade de membrana plasmática por microscopia de fluorescência através da associação das sondas Iodeto de Propídeo e Diacetato de 6-carboxifluoresceína.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo não houve diferença significativa entre os valores dos parâmetros espermáticos de motilidade total e motilidade progressiva das amostras quando comparadas as diferentes formas de refrigeração. No entanto, quando avaliada a integridade de membrana plasmática, observou-se inferioridade na utilização do sistema Equitainer[®] em relação aos outros sistemas estudados ($p < 0,05$). Melo et al (2006) utilizaram o sistema Minitub[®] para o período de estabilização das amostras seminais

durante 20 minutos a 5°C e obtiveram resultados de motilidade total e progressiva (68,9%; 31,6%) similares ao do presente experimento (GM: 67,1%; 32,1% - GB: 65,2%; 31,9% - GE: 63,4%; 30,4%).

Tabela 1: Médias e desvios padrão (%) dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP) das amostras de sêmen descongeladas, submetidas ao período de estabilização prévio a congelação nos sistemas Minitüb®, Botutainer® e Equitainer®

Sistemas			
Variáveis	Minitüb®	Botutainer®	Equitainer®
MT	67,16±10,34	65,60±10,63	63,46±11,45
MP	32,10±7,84	31,90±6,71	30,40±7,27
IMP	49,43±5,43 ^a	48,70±7,12 ^a	44,90±6,74 ^b

Médias seguidas de diferentes letras, na mesma linha, diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

O sistema Equitainer® demonstrou ser significativamente inferior ao sistema Botutainer® e ao refrigerador Minitüb® na manutenção da integridade de membrana plasmática das células espermáticas. A superioridade do sistema Minitüb® em relação ao Equitainer®, neste experimento, pode ser explicada pela manutenção do controle automatizado da temperatura promovido pelo refrigerador. No entanto, Avanzi et al. (2007) compararam os sistemas Botutainer® e Equitainer® sob diferentes temperaturas simulando estresse térmico pelo frio (-4°C), pelo calor (38°C), além da temperatura ambiente (24°C), diferentemente do que foi observado no presente experimento, não foram encontradas diferenças significativas da integridade de membrana plasmática entre os sistemas testados sob diferentes temperaturas.

Apesar da manutenção da viabilidade espermática, as taxas de refrigeração utilizadas no presente estudo (3,4°C/min. no refrigerador programável e 1,13°C/min nos sistemas de transporte) foram diferentes das taxas recomendadas por Kayser et al (1992). Estes autores concluíram que o espermatozóide equino pode ser refrigerado

rapidamente de 37 a 20°C, mas deve ser refrigerado a uma taxa menor que 0,1°C por minuto e preferencialmente a 0,05°C por minuto, de 20 a 5°C para manter a máxima sobrevivência espermática. Os sistemas de transporte refrigerado Equitainer® e Botutainer® apresentam taxas de refrigeração de 0,03 e 0,05°C/min. respectivamente e são considerados adequados à biotecnologia de sêmen refrigerado.

Apesar das curvas utilizadas no presente trabalho serem mais rápidas do que as recomendadas por Kayser et al. (1992), as três metodologias testadas permitiram a obtenção de bons resultados de motilidade total (G1=67,1%, G2=65,2%, G3=63,4%), motilidade progressiva (G1=32,1%, G2=31,9%, G3=30,4%) e integridade de membrana plasmática (G1=49,4%^a, G2=48,7%^a, G3=44,9%^b), demonstrando que os três dispositivos foram eficientes na estabilização seminal prévia a congelação. Esta similaridade talvez possa ser explicada com base nos animais utilizados por apresentarem sêmen de alta congelabilidade e o meio diluente Botu-Crio®, que tem demonstrado oferecer uma maior proteção as células espermáticas durante o processo de congelação de sêmen equino em comparação aos diluentes mais utilizados no mundo, INRA 82 e Lactose-EDTA-gema de ovo, conforme descrito por Pasquini et al (2007).

A maior dificuldade encontrada na utilização do sistema Equitainer®, no experimento I foi o armazenamento das palhetas em seu interior, já que a altura do recipiente interno deste sistema é menor do que a altura das palhetas de 0,5mL utilizadas, ocorrendo o dobramento de algumas amostras que tiveram que ser desprezadas. No sistema Botutainer®, não houve dificuldade no armazenamento das palhetas visto que foi desenvolvido e adaptado a palhetas de 0,5 e 0,25 mL.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que se realizou o presente trabalho foi possível concluir que os sistemas de transporte refrigerado de sêmen equino Botutainer® e Equitainer® são tão eficientes quanto o refrigerador programável Minitüb® no período de estabilização seminal prévio à congelação, facilitando o procedimento de congelação de sêmen a campo

REFERÊNCIAS

- AMANN, D.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: Mc KINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Eds). *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745, 1992.
- AVANZI, B.R. PAPA, F.O.; RAMOS, S.A.; FARRAS, M.C.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DELL'ÁQUA JR., J.A.; MEDEIROS, A.S.L. Avaliação de diferentes sistemas de transporte de sêmen eqüino refrigerado na manutenção da viabilidade espermática. *Acta Scien. Vet. Supl. 3*, V. 35, p.1310, 2007.
- FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; MAFILLI, V.V.; PROSPERI, C.P.; LIMA NETO, A. Efeito do resfriamento na criopreservação do sêmen eqüino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, n.3, p. 348, 2003.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *ARS Vet.*, v.10, n.2, p.156-165, 1994
- KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, E.L.; JASKO, D.L.; PICKETT, B.W.. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.601-614, 1992.
- MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; ZANH, F.S.; MARTIN, I.; FELÍCIO, G.B.; DELL'ÁQUA JR, J.A.; PAPA, F.O. Comparação entre dois sistemas de transporte na viabilidade de sêmen equino refrigerado por 24 horas antes da congelação. *Acta Scien. Vet. Supl.1*, V. 34, 2006.
- PASQUINI, D.F.; FERREIRA, H.N.; PAPA, F.O.; DELL'ÁQUA JR. J.A.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Resultados preliminares dos parâmetros espermáticos de sêmen eqüino congelado com três dos diluentes mais utilizados no mundo. *Acta Scien. Vet. Supl. 3*, V. 35, p.1007, 2007.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W., GRAHAM, J.K. VANDERWALL, D.K., McCUE, P.M.; BRUMMER, JE. *Cooled and frozen stallion semen*. Colorado: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, 1999. (Bulletin 9).

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22⁰C instead of 4⁰C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*. v.54, p.907-19, 2000.

A ser enviado à revista "Veterinária e Zootecnia"

Estudo de diferentes sistemas e curvas de congelação na eficiência da congelabilidade e fertilidade de sêmen eqüino.

Bruna De Vita¹, Cely Marini Melo¹, Márcio Teoro do Carmo¹, Marco Antônio Alvarenga¹,
Frederico Ozanam Papa¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária- UNESP/Botucatu

Resumo

O presente estudo objetivou comparar diferentes curvas de congelação utilizando-se uma máquina com curvas programadas (TK3000[®]) com congelação em vapor de nitrogênio líquido, utilizando sêmen de garanhões de alta e baixa congelabilidade. No experimento I foram utilizados 4 garanhões com sêmen de alta congelabilidade. Três curvas foram programadas na TK3000[®] (C1, C2, C3) em comparação com a metodologia em caixa de isopor (GC). As comparações foram realizadas em relação ao GC e não apresentaram diferença significativa. Valores em porcentagem de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP): GCxC1 (70 x 67,5; 35,7 x 32; 48,3 x 46); GCxC2 (63,3 x 67,66; 33,3 x 34,8; 45,4 x 48,3); GCxC3 (63,2 x 65; 32,2 x 32,4; 48,09 x 49,3). No teste de fertilidade, as inseminações foram realizadas com amostras congeladas com C2 e GC apresentando índices de prenhez de 65 e 60% respectivamente, sem diferença significativa. A TK3000[®] foi tão eficaz quanto à metodologia de congelação em caixa de isopor em relação à congelabilidade e fertilidade. Todas as curvas testadas foram eficientes na manutenção da viabilidade espermática. No experimento II, foram utilizados 8 garanhões da raça Mangalarga Marchador. As amostras foram divididas e congeladas simultaneamente em duas máquinas em diferentes curvas (G2 e G3) e na caixa de isopor (GC). Para a análise estatística, as amostras seminais foram divididas em dois grupos de acordo com a motilidade total pós-descongelação (acima ou abaixo de 50%). Os resultados das amostras que apresentaram índice acima de 50% pós-descongelação: MT (GC: 61,8%^b; G2: 75,0%^a; G3: 66,3%^{ab}); MP (GC: 28,0%^b; G2: 41,0%^a; G3: 27,5%^b); IMP (GC: 51,3%^a; G2: 55,0%^a e G3: 53,5%^a), demonstram superioridade significativa do G2 em relação GC na MT e do G2 em relação ao GC e G3 na MP. Os resultados das amostras que apresentaram índice abaixo de 50% pós-descongelação MT (GC: 13,3%^b; G2: 20,5%^a; G3: 19,5%^{ab}); MP (GC: 3,8%^a; G2: 6,8%^a; G3: 6,0%^a); IMP (GC: 16,8%^a; G2: 20,8%^a e G3: 19,5%^a), demonstram superioridade do G2 na MT. A curva mais rápida da TK3000[®] demonstrou ser mais eficaz na congelabilidade de animais da raça Mangalarga Marchador considerados "poor freezers"

Palavras-chave: Eqüino; Sêmen; Curvas de Congelação; Fertilidade

Introdução

O processo de congelação de sêmen eqüino envolve inúmeros eventos físico-químicos que são responsáveis pela integridade e viabilidade espermática, assim como pela fertilidade do sêmen congelado eqüino (Graham, 1996).

A busca de taxas ótimas de refrigeração/congelação e descongelação das células espermáticas tem sido motivo de estudos em diversas espécies de animais. Fiser e Fairfull (1990) estudaram os fatores velocidade de congelação, nível de glicerol no meio de congelação e sistema de envase para o sêmen de suínos. Os melhores resultados de motilidade e integridade acrossomal foram obtidos com a utilização de 3% de glicerol no meio diluente e uma velocidade de congelação de 30⁰C/min com o sêmen acondicionado em palhetas de 0,5 mL.

Em outro estudo, espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo de cães foram congelados em palhetas de 0,25 mL a diferentes taxas (0,5, 3, 11, 58 ou 209°C/min). As taxas de 0,5 e 3°C/min foram obtidas utilizando-se dispositivos próprios para congelação, enquanto as taxas de 11, 58 e 209°C/min foram determinadas pela distância entre as palhetas e o nitrogênio líquido. A motilidade espermática após a descongelação foi reduzida com baixas taxas de congelação, atingiu valores máximos à taxa de 11°C/min e diminuiu significativamente ($P<0,01$) com taxas de congelação mais elevadas (YU et al., 2002).

Blanco et al (2000) compararam a sobrevivência espermática após congelação rápida (50°C/min) ou lenta (1°C/min de +4 a -20°C seguido de 2°C/min de -20 a -70°C) do sêmen de seis espécies de aves (galo, peru, águia dourada, águia de Bonelli, águia imperial e falcão peregrino) e observaram que a congelação rápida foi prejudicial em quatro das seis espécies estudadas, mostrando as variações interespecíficas existentes.

A comparação de três métodos de congelação de sêmen suíno por meio de máquinas mostrou resultados significativamente superiores em parâmetros de motilidade computadorizada e viabilidade espermática quando foram usados equipamentos que impunham uma velocidade de congelação em torno de 40°C/min em comparação à velocidade de congelação de 6°C/min (Thurston et al., 2003).

Kumar et al. (2003), compararam as curvas de 1°C/min, 30°C/min e 50°C/min para a congelação de sêmen de bovino, ovino e suíno em duas máquinas programáveis de congelação, sendo uma comercial (Planer Cryo 10[®]) e outra máquina não comercial

desenvolvida por Medrano et al. (2002). Os autores concluíram que a curva de 30°C/min e que a máquina desenvolvida por Medrano foram mais eficientes entre manutenção da viabilidade espermática nas três espécies estudadas.

A avaliação da permeabilidade da membrana espermática à água durante a congelação a diferentes taxas, mostrou que as taxas de congelação de 29°C/Min e 60°C/Min são as mais adequadas à congelação de sêmen de garanhões em meios diluidores com e sem crioprotetor (Devireddy et al., 2002).

Um recente trabalho (Clulow et al, 2007) demonstrou que a motilidade total pós-descongelação de amostras em diferentes concentrações (40 e 400x10⁶) e diferentes volumes (0,25 e 0,5mL) foi consistentemente mais alta quando a congelação foi feita em máquina de congelação programável, em comparação a utilização da caixa Styrofoam[®] contendo nitrogênio líquido. A curva programada na máquina de congelação Planer Kryo[®] foi de 50°C/min. por um minuto, seguida de 10°C/min. por seis minutos e aumentando gradativamente até 50°C/min. até que a temperatura das amostras atingisse 110°C. Posteriormente esta taxa foi mantida até que temperatura das palhetas alcançassem 150°C. Esta curva foi baseada na taxa de congelação da caixa Styrofoam[®], observada em mensuração prévia.

O presente estudo teve por objetivo testar a eficiência de diferentes curvas de congelação inseridas num aparelho computadorizado, brasileiro e portátil (TK3000[®]) e compará-las com a metodologia usual de congelação em caixa de isopor, utilizando garanhões que apresentam sêmen de alta e baixa congelabilidade

Material e Método

Experimento I

Foram utilizados 4 garanhões de com idades entre 5 e 20 anos, das raças Westfallen, Quarto de Milha, Puro Sangue Árabe e Hannoverano, pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ) e Departamento de reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP/Botucatu. Para o teste de fertilidade foram utilizados 2 ciclos (um ciclo por grupo) de 23 éguas mestiças com idades entre 5 e 15 anos, e um garanhão de fertilidade comprovada da raça Westfallen também pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ) e Departamento de reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP/Botucatu.

Nove ejaculados dos garanhões de cada garanhão foram utilizados, totalizando 36 ejaculados. A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial modelo (Biotech Botucatu, SP, Brasil), composta por um tubo rígido de PVC, mucosa de látex e mucosa plástica descartável, acoplada a um copo coletor isotérmico contendo uma camisa sanitária descartável, na temperatura de aproximadamente 45°C.

Cada ejaculado foi filtrado com auxílio de um filtro de nylon e o volume mensurado em proveta graduada. Em seguida, foi feita avaliação macroscópica quanto à cor, odor e aspecto com o objetivo de eliminar amostras que apresentassem alguma anormalidade. Uma pequena alíquota foi retirada para avaliação dos parâmetros de motilidade total e progressiva (CASA) e concentração, realizada em microscópio de luz com contraste de fase (20X), com auxílio de uma câmara de Neubauer após diluição na proporção de 1:20 (sêmen/água destilada).

Para a congelação das amostras foram utilizadas 3 diferentes curvas de congelação programadas em uma máquina automatizada (TK3000® - TK tecnologia em congelação, Uberaba, Brasil). O período de resfriamento a 5°C das amostras dos grupos congelados na máquina foi realizado com uma curva de 0,5°C/min. As amostras do Grupo Controle (GC) foram refrigeradas a 5°C em refrigerador programável Minitüb® por 20 minutos. A congelação foi realizada utilizando uma caixa de isopor de 40 litros de dimensões de 40x30x25cm, contendo 3,5 cm de nitrogênio líquido, na qual as palhetas eram dispostas a 6 cm do nível do nitrogênio por 20 minutos e congeladas por imersão direta no mesmo.

As curvas programadas na máquina foram: **Curva 1-** Curva similar a curva de congelação a 6 cm do nível do N₂ em caixa de isopor (**C1**): 15°C/min. entre +5°C e -60°C 4°C/min. entre -60°C e -100°C ; **Curva 2-** Curva de aceleração constante, na velocidade máxima permitida pela máquina (**C2**): 20°C/min. entre +5°C e -100°C e **Curva 3-** Curva inicial na velocidade máxima permitida pela máquina, seguida de uma desaceleração baseada na que ocorre na curva da caixa de isopor quando a 6 cm do nível de N₂ (**C3**): 20°C/min. até -60°C e posteriormente a uma curva de 10°C/min. entre -60°C e -100°C. Cada ejaculado foi dividido em duas amostras, sendo uma submetida à congelação usual (**GC**) e a outra na máquina programada com uma das 3 curvas (**C1, C2 ou C3**). Sendo assim, as comparações dos resultados das taxas de congelação foram realizadas sempre em relação ao seu grupo controle.

As palhetas foram descongeladas em banho Maria a 46°C por 20 segundos (Dell'Aqua Jr., 2000) e os parâmetros espermáticos foram avaliados utilizando-se o

sistema computadorizado Hamilton Thorm (CASA), e integridade de membrana plasmática (IMP) por microscopia de fluorescência através da associação das sondas diacetato de 6-carboxifluoresceína e iodeto de propídeo segundo Zúccari (1998).

As amostras de sêmen para o teste de fertilidade foram colhidas, analisadas, centrifugadas, ressuspensas e envasadas como descrito no experimento I. Cada amostra foi dividida em dois grupos sendo o Grupo Controle (GC) congelado com a metodologia usual descrita no experimento I e o Grupo 2 em que os ejaculados foram congelados na máquina TK3000, utilizando-se a curva de número 2 (C2). Apesar de não haver diferença significativa entre as diferentes curvas automatizadas estudadas, foi escolhida a curva 2, por ser a mais rápida programada na TK3000®.

O teste de fertilidade foi feito no período de Janeiro a Março de 2007 nas instalações do Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ). As éguas foram monitoradas diariamente através de palpação retal e ultrassonografia. A indução da ovulação foi realizada através da administração de 1mg de deslorelina por via intramuscular no momento em que as éguas apresentavam um folículo pré-ovulatório de aproximadamente 35 mm de diâmetro. Foram realizadas duas inseminações (pré e pós-ovulação) com 400×10^6 de espermatozoides viáveis cada, no ápice do corno ipsilateral à ovulação com auxílio de uma pipeta de inseminação flexível (Minitüb®) e o diagnóstico de gestação foi realizado entre 12 e 15 dias após a detecção da ovulação, por meio de ultrassonografia.

Experimento II

Ao término do Experimento I, observou-se que não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, quer seja laboratorial, quer seja na fertilidade, provavelmente por terem sido utilizados garanhões de alta congelabilidade do sêmen, o que motivou a execução do Experimento II com garanhões de baixa congelabilidade do sêmen pertencentes à raça Mangalarga Marchador. No momento da realização do Experimento II foi possível utilizar dois exemplares da máquina TK3000®, o que possibilitou o teste de novas curvas com um mesmo ejaculado.

Foram utilizados 8 garanhões da raça Mangalarga Marchador, sendo sete pertencentes ao Haras Ogar, situado na cidade de Lins, no estado de São Paulo e um pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ) e Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP/Botucatu. Para o experimento, utilizou-se um ejaculado de cada garanhão.

Para os animais locados no Haras Ogar-Lins, foi realizada a análise da motilidade total do sêmen dos 7 animais de forma subjetiva com auxílio de um microscópio de luz, imediatamente após a colheita e diluição com o meio Botu-Sêmen[®] (Biotech Botucatu, SP-Brasil). A análise laboratorial do sêmen do garanhão pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP/Botucatu, foi feita da mesma maneira descrita no Experimento I.

As amostras colhidas no Haras Ogar foram diluídas em meio diluente Botu-Sêmen[®] na proporção de 2:1 (diluente:sêmen) e armazenadas por um período de 3 hs no sistema de transporte refrigerado Botutainer[®], ou seja, tempo necessário para o transporte do Haras até o laboratório. Os ejaculados colhidos no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária foram submetidos à mesma diluição e período de refrigeração para padronização do procedimento. Após o período de refrigeração, uma alíquota de 1 mL de todas as amostras foi aquecida por 10 minutos a 36°C e então avaliadas quanto a motilidade total e progressiva pelo CASA.

A centrifugação, ressuspensão e envase foram efetuadas da mesma forma descrita no Experimento I. Após o processamento, as amostras foram então divididas em três grupos e congeladas simultaneamente:

Grupo Controle (GC): Metodologia usual de congelação em caixa de isopor descrita no experimento I.

Grupo 2: Congelação realizada através da máquina de congelação TK3000, programada com uma curva de 25°C por minuto até -120°C.

Grupo 3: Congelação realizada através da máquina de congelação TK3000, programada com uma curva de 20°C/min. entre +5°C e -60°C e 10°C/min. entre -60°C e -100°C.

Após a descongelação das palhetas (descrita no Experimento I), os parâmetros espermáticos foram avaliados pelo CASA, e a integridade de membrana plasmática (IMP) por microscopia de fluorescência através da associação das sondas diacetato de 6-carboxifluoresceína e iodeto de propídeo.

Para a análise estatística, as amostras foram divididas em dois grupos de acordo com a porcentagem de motilidade total (acima ou abaixo de 50%) com o intuito de

diminuir os efeitos do alto desvio padrão encontrado quando as amostras são comparadas em apenas um grupo.

Resultados

Experimento I

Os valores, dos parâmetros Motilidade Total, Motilidade Progressiva e Integridade de Membrana Plasmática não diferiram significativamente entre as amostras congeladas com a metodologia usual (GC) e com a curva 1 inserida na Máquina TK 3000 (C1), conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Médias e desvios padrão, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob a curva C1 da máquina de congelação TK3000 e seu respectivo Grupo Controle.

Curvas Utilizadas		
Variáveis	GC (Caixa de Isopor)	C1 (TK3000)
MT	70,08±6,46	67,5±6,29
MP	35,75±8,47	32,00±9,00
IMP	48,33±5,12	46,08±5,31

Quando comparadas a metodologia usual (GC) e a máquina de congelação TK3000, programada com a curva 2 (C2), também não houve diferença significativa entre as variáveis Motilidade Total, Motilidade Progressiva e Integridade de Membrana Plasmática. Os resultados, em porcentagem, estão evidenciados na Tabela 2.

Tabela 2: Médias e desvios padrão, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob a curva C2 da máquina de congelação TK3000 e seu respectivo grupo controle GC congelado

Curvas Utilizadas		
Variáveis	GC (Caixa de Isopor)	C2 (TK3000)
MT	63,00±9,05	67,67±10,74
MP	33,08±5,17	33,90±9,20
IMP	45,41±7,77	48,33±7,40

Quando utilizada a máquina TK3000 programada com a curva 3 (C3) em comparação a metodologia usual (GC), os parâmetros seminais estudados Motilidade Total, Motilidade Progressiva e Integridade de Membrana Plasmática também não diferiram significativamente, como ratificado na Tabela 3, a seguir:

Tabela 3: Médias e desvios padrão, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob a curva C3 da máquina de congelação TK3000 e seu respectivo grupo controle GC congelado

Curvas Utilizadas		
Variáveis	GC (Caixa de Isopor)	C3 (TK3000)
MT	63,25±12,13	65,00±8,42
MP	31,66±7,08	32,41±3,86
IMP	48,72±6,14	50,00±5,40

Os índices de prenhez encontrados quando da utilização de sêmen congelado com a metodologia usual (GC) e com a máquina TK3000 programada com a curva 2 (G2) nas inseminações artificiais não diferiram significativamente conforme demonstra a Tabela 4.

Tabela 4: Número de éguas prenhes e não prenhes e índice de prenhez obtidos através da inseminação artificial de 46 ciclos de 23 éguas utilizando sêmen congelado sob a curva C2 da máquina de congelação TK3000 e do grupo controle, congelado em caixa de isopor

Metodologia		
Éguas	GC (Caixa de Isopor)	G2 (TK3000)
Prenhes	14	15
Não Prenhes	9	8
Índice de Prenhez	60%	65%

Experimento II

Quando comparadas as médias e desvios padrão da motilidade total do sêmen dos animais que apresentaram índice acima de 50% pós-descongelação, observou-se que o Grupo 2 foi significativamente superior ao Grupo Controle, no entanto não houve diferença quando comparado ao Grupo 3. Em relação à motilidade progressiva, o Grupo 2 foi significativamente superior aos demais grupos. Já, quando comparados os valores de integridade de membrana plasmática não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados conforme demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5: Médias e desvios padrão dos parâmetros espermáticos motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP), em porcentagem, das amostras seminais que apresentaram motilidade total acima de 50% pós-descongelação, do grupo controle “GC” (caixa de isopor) e das curvas do grupo G2 e G3 (máquinas de congelação).

Metodologia			
Variáveis	GC	G2	G3
MT	61,8±8,3 ^b	75,0±5,5 ^a	66,3±4,5 ^{ab}
MP	28,0±7,5 ^b	41,0±7,0 ^a	27,5±1,3 ^b
IMP	51,3±7,4 ^a	55,0±6,3 ^a	53,5±7,7 ^a

Médias seguidas de diferentes letras, na mesma linha, diferem estatisticamente ($p < 0,05$)

Quando comparadas as médias e desvios padrão da motilidade total do sêmen dos animais que apresentaram índice abaixo de 50% pós-descongelação, observou-se que o Grupo 2 foi significativamente superior ao Grupo Controle, no entanto não houve diferença quando comparado ao Grupo 3. Em relação à motilidade progressiva e integridade de membrana plasmática, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados, de acordo com a Tabela 6.

Tabela 6: Médias e desvios padrão dos parâmetros espermáticos motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP), em porcentagem, das amostras seminais que apresentaram motilidade total abaixo de 50% pós-descongelação, do grupo controle “GC” (caixa de isopor) e das curvas do grupo G2 e G3 (máquinas de congelação).

Metodologia			
Variáveis	GC	G2	G3
MT	13,3±2,2 ^b	20,5±3,3 ^a	19,5±5,2 ^{ab}
MP	3,8±1,5 ^a	6,8±3,0 ^a	6,0±3,2 ^a
IMP	16,8±3,9 ^a	20,8±5,4 ^a	19,5±7,0 ^a

Médias seguidas de diferentes letras, na mesma linha, diferem estatisticamente (p<0,05)

Discussão

Nos Experimentos I e II foram comparadas diferentes curvas inseridas em uma máquina nacional e portátil de congelação de sêmen (TK3000[®]) em comparação com a metodologia de congelação em caixa de isopor. Além de facilitar o procedimento de congelação nas propriedades rurais, as máquinas programáveis colaboram com os estudos que buscam encontrar taxas ideais de congelação seminal para as diferentes espécies. Ainda são poucos os trabalhos em relação à taxa ideal de congelação para o sêmen equino, o que dificulta a comparação entre os resultados.

O período de estabilização dos grupos congelados na caixa de isopor foi realizado no refrigerador Minitüb[®] (3,4°C/min) por 20 minutos e dos grupos congelados na máquina TK3000[®] foi feito na mesma (0,5 /min) por aproximadamente 40 minutos, não sendo observadas diferenças significativas quanto aos valores de motilidade total, progressiva e integridade de membrana plasmática. Estes achados contrariam os

observados por Blanes et al. (2005), que demonstraram que a motilidade total foi superior quando a estabilização foi realizada a 5°C por 20 minutos em comparação a 60 minutos com o diluente Botucio[®].

No presente experimento, apesar de mais lentas do que a curva ótima sugerida por Devireddy et al. (2002) (~29 sem adição de crioprotetores e ~69°C/minuto com adição de crioprotetores), as curvas de congelação **C1**(15°C/min. entre +5°C e -60°C e 4°C/min. de -60°C até -100°C); **C2**(20°C/min. entre +5°C até -100°C) e **C3**(20°C/min. até -60°C e 10°C/min. entre -60°C até -100°C), programadas na máquina TK3000[®] demonstraram ser tão eficientes quanto a metodologia em caixa de isopor na manutenção da viabilidade espermática. Deve-se levar em consideração que os resultados de Devireddy et al. (2002) foram obtidos através da avaliação da permeabilidade da membrana espermática à água durante a congelação em diferentes taxas, feita através de um equipamento termoanalítico e que o glicerol foi o crioprotetor utilizado, sendo que as taxas poderiam variar se as amidas fossem utilizadas.

A semelhança entre os resultados das diferentes curvas testadas em relação ao controle na caixa de isopor, no presente experimento, provavelmente pode ser explicada pela utilização de garanhões que apresentam sêmen de alta congelabilidade. Esses achados corroboram com os descritos por Papa et al. (2003), que não observaram diferenças na motilidade e integridade de membrana pós descongelação de espermatozóides eqüinos congelados a diferentes alturas do nitrogênio líquido (1,3,6 e 9 cm) e com os achados de Clulow et al. (2007) que ao comparar uma mesma curva executada na máquina Planer Kryo[®] e na caixa de isopor Styrofoam[®] (50°C/min. por um minuto, seguida de 10°C/min. por seis minutos e aumentando gradativamente até 50°C/min. até que a temperatura das amostras atingissem 110°C, esta taxa foi mantida até que temperatura das palhetas alcançasse 150°C) observaram que não houve diferença significativa entre os parâmetros de motilidade total e integridade acrossomal (eosina-nigrosina). Devireddy et al. (2002), também observaram que o percentual de membrana plasmática íntegra não diferiu significativamente quando utilizadas as curvas de 20, 50, 70 e 130°C/min nas amostras com crioprotetor.

A eficiência na manutenção da viabilidade espermática observada no presente experimento, mesmo tendo utilizado curvas mais lentas do que as sugeridas por Devireddy et al. (2002) e Clulow et al. (2007), pode ser explicada pela utilização de

taxas moderadas e não lentas de congelação. As taxas moderadas não expõem as células por um período muito longo à fase de liberação de calor latente de fusão que ocorre na fase de formação de cristais de gelo (-10°C). Este fato também pode ser atribuído à ação do diluente Botu-Crio[®] que conforme os resultados encontrados por Pasquini et al. (2007) ofereceu maior proteção as células espermáticas durante a congelação em comparação aos diluentes mais utilizados no mundo INRA 82 e Lactose-EDTA-gema de ovo. A utilização de animais com sêmen de alta congelabilidade também podem ter contribuído na observação destes resultados.

Para o teste de fertilidade a curva de congelação escolhida para ser utilizada foi a C2 ($20^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) por ser a mais rápida entre as curvas programadas na TK3000[®] e portanto mais prática. A análise estatística dos dados demonstrou não haver diferença entre os índices de prenhez obtidos com o sêmen congelado através da máquina TK3000 (65%) e com a metodologia usual em caixa de isopor (60%), demonstrando que as duas metodologias foram eficientes.

A raça Mangalarga Marchador foi escolhida e utilizada no Experimento II, visto que a mesma apresenta uma menor resistência ao processo de congelação e descongelação quando comparada a diversas raças, entre elas podemos destacar as germânicas e a Quarto de Milha que foram utilizadas no Experimento I. Esta resistência menor a congelabilidade já havia sido observada por Alvarenga et al. (1992) e Alvarenga (2002) apesar dos autores terem utilizado diluidores diferentes dos atuais.

No entanto, experimentos que testaram diferentes taxas e curvas de congelação na espécie equina sempre usaram garanhões de boa ou alta congelabilidade resultando em semelhanças nos dados de motilidade total observados por Clulow et al. (2007), bem como os obtidos por Devireddy et al. (2002) que trabalharam com permeabilidade de membrana à água.

A curva C1 ($15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre $+5$ e -60°C e $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre -60 e -100°C), utilizada no Experimento I, simulava a curva realizada pela congelação na caixa de isopor e neste experimento optou-se por não usá-la, mantendo apenas a congelação na caixa de isopor como metodologia controle (GC). A partir deste momento utilizou-se a curva mais rápida programada no segundo exemplar da máquina, G2 ($25^{\circ}\text{C}/\text{min.}$) e a curva intermediária entre as programadas na máquina TK3000[®] utilizada no Experimento II, C3 ($20^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ até -60°C e $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre -60 e -100°C) que neste experimento foi renomeada como G3.

Os oito garanhões considerados como animais de baixa resistência seminal à congelação apresentaram grande variação entre seus resultados de motilidade total e motilidade progressiva demonstrando existir variações mesmo entre indivíduos de uma mesma raça em relação à resistência seminal à congelação como descrito por Alvarenga (2002). Para que o alto desvio padrão não exercesse influência na análise estatística, estes ejaculados foram divididos em dois grupos de acordo com a motilidade total pós-descongelação (acima ou abaixo de 50%) e analisados separadamente.

Quando comparadas as médias e desvios padrão da motilidade total do sêmen dos animais que apresentaram índice acima de 50% pós-descongelação, observou-se que o Grupo 2 (75,0%) foi significativamente superior ao Grupo Controle (61,8%), no entanto não houve diferença quando comparado ao Grupo 3 (66,3%). Em relação à motilidade progressiva, o Grupo 2 (41,0%) foi significativamente superior aos demais grupos (GC: 28,0% e G3: 27,5%). Quando comparados os valores de integridade de membrana plasmática não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (GC: 51,3%; G2: 55,0% e G3: 53,5%). Já, quando comparadas as médias e desvios padrão da motilidade total do sêmen dos animais que apresentaram índice abaixo de 50% pós-descongelação, observou-se que o Grupo 2 (20,5%) foi significativamente superior ao Grupo Controle (13,3%), no entanto não houve diferença quando comparado ao Grupo 3 (19,5%). Em relação à motilidade progressiva (GC: 3,8%; G2: 6,8% e G3: 6,0%) e integridade de membrana plasmática (GC: 16,8%; G2: 20,8% e G3: 19,5%), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados.

Como era esperado, a utilização de animais de baixa resistência seminal à congelação evidenciou uma tendência de melhores resultados em relação à manutenção da viabilidade do sêmen quando da utilização de curvas de congelação mais rápidas para animais considerados “poor freezers”, que conforme achados de Medeiros et al. (2007), demonstram ter uma menor eficiência na regulação do equilíbrio osmótico celular. Estes resultados corroboram com os de Thurston et al. (2003) que demonstraram que a curva de congelação mais rápida (40°C/min) foi superior à curva mais lenta (6°C/min) na eficiência da congelação de sêmen suíno, por manter a curva de congelação mais homogênea.

A utilização de um crioprotetor do grupo das amidas no meio diluente Botu-Crio[®] (dimetilformamida) também contribuiu para melhores resultados na manutenção da viabilidade espermática de animais de baixa resistência seminal à congelação, por

apresentarem um menor peso molecular e serem mais permeáveis ao espermatozóide acarretam menores injúrias principalmente às células espermáticas de animais com menor eficiência na regulação do equilíbrio osmótico durante a congelação, corroborando com os achados de Medeiros et al. (2007) que observaram melhores índices de fertilidade quando utilizaram sêmen congelado contendo amidas em relação ao glicerol (dimetilacetamida 56%, metilformamida 62%, dimetilformamida 52% e glicerol 30%).

Conclusão

Com base nos resultados obtidos e nas condições em que se realizou o presente trabalho foi possível concluir que todas as curvas testadas no Experimento I foram eficientes na congelabilidade de sêmen eqüino em relação aos parâmetros espermáticos estudados e que máquina de congelação TK3000[®] foi tão eficaz quanto à metodologia de congelação em caixa de isopor. Com relação à fertilidade, tanto a congelação automatizada como a realizada na caixa de isopor foram eficazes. A curva mais rápida da máquina TK3000[®] demonstrou ser mais eficaz na congelabilidade do sêmen de animais da raça Mangalarga Marchador considerados “poor freezers”.

Referências Bibliográficas

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

ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O.; BURATINI JUNIOR, J. Influência da raça e parâmetros espermáticos sobre a congelabilidade de sêmen de garanhões. In: IV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 1992, Araçatuba. **Anais...**Araçatuba: CBMV, 1992, p.94.

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

CLULOW, J.R.; MANSFIELD, L.J.; MORRIS, L.H.L.; EVANS G., MAXWELL, W.M.C. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Anim. Reprod. Scie**. In press...2007.

DEVIREDDY, R.V. Cryopreservation of equine spermatozoa: optimal cooling rates in the presence and absence of crioprotective agents determined using differential scanning calorimetry. v.66. p.222-231. **Biol. Reprod**. 2002.

FISER, P.S.; FAIRFULL, R.W. Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5ml straws. **Mol. Reprod. Dev.**, v.25 (2), p.123-129, 1990.

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

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

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volumen sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides eqüinos criopreservados.** Pirasununga, 2006. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo.

PASQUINI, D.F. FERREIRA, H.N. PAPA, F.O. DELL'AQUA JR. J.A.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. Resultados preliminares dos parâmetros espermáticos de sêmen eqüino congelado com três dos diluentes mais utilizados no mundo. **Acta Scien. Vet.** Supl. 3, V. 35, p.1007, 2007.

THURSTON, L.M.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. **Theriogenology** v.60 (1) p.101-113, 2003.

YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.A., LEIBO, S.P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. **Cryobiology** v.44 p.62-78, 2002.

ANEXO 1: Ajuste do HTMA-IVOS-10 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	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	80%
Referência para velocidade (VAP) média	<70µm/s
Referência para velocidade (VAP) lenta	<30µm/s
Referência para velocidade (VSL) lenta	<20µm/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

ANEXO 2: Descrição dos constituintes das soluções de estoque utilizadas no preparo da solução de trabalho utilizada na técnica de avaliação de integridade de membrana plasmática do sêmen congelado.

Solução de Estoque das Sondas Fluorescentes		
Soluções	Constituintes	Quantidades
Estoque IP	Iodeto de Propídeo ¹	10mg
	Solução Fisiológica	20mL
Estoque CDFA	Diacetato de 6-carboxifluoresceína ²	9,2mg
	DMSO	20mL
Estoque de Formaldeído	Formalina a 40%	1mL
	Solução Fisiológica	79mL
Estoque de Citrato de Sódio	Citrato de Sódio	3g
	Solução fisiológica	100mL

¹ P 4170 – Sigma

² C 5041 - Sigma

ANEXO 3: Constituintes da solução de trabalho utilizada na avaliação de integridade de membrana plasmática do sêmen congelado.

Solução	Quantidade
Solução de Citrato de Sódio 3%	0,96mL
Solução de Formaldeído	10µL
Solução de Iodeto de Propídeo	10µL
Solução de Carboxifluoresceína	20µL

Anexo 4:

Tabela 10: Dados encontrados, em porcentagem, de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP) das amostras de sêmen a fresco dos ejaculados utilizados no experimento I e II.

Ejaculado	MT (%)	MP (%)
1	79	33
2	93	29
3	88	34
4	93	31
5	82	30
6	86	46
7	84	38
8	83	37
9	87	38
10	83	37
11	88	41
12	88	43
13	92	44
14	86	46
15	82	37
16	92	40
17	92	39
18	93	41
19	90	39
20	85	42
21	95	56
22	89	36
23	90	47
24	88	29
25	75	25
26	76	36
27	89	43
28	93	47
29	91	48
30	87	41
31	89	36
32	76	36
33	90	47
34	79	35
35	88	29
36	75	25

Tabela 11: Dados de motilidade total e progressiva e integridade de membrana plasmática por ejaculado, do sêmen descongelado submetido ao período de estabilização nos sistemas Minitüb®, Botutainer® e Equitainer® previamente a congelação em caixa de isopor.

Ejac.	MT			MP			IMP		
	Minitüb®	Botutainer®	Equitainer®	Minitüb®	Botutainer®	Equitainer®	Minitüb®	Botutainer®	Equitainer®
1	68	65	63	33	29	24	50	40	38
2	84	86	79	50	38	38	55	54	41
3	76	73	73	42	37	43	53	53	53
4	79	64	74	38	39	38	51	42	46
5	64	66	59	30	28	27	49	51	48
6	69	61	59	32	28	29	40	38	35
7	63	70	66	30	40	43	51	56	52
8	68	74	68	36	36	39	49	51	49
9	62	73	64	25	38	32	39	50	32
10	71	48	66	30	21	30	45	25	40
11	72	68	64	28	27	27	54	50	48
12	65	74	69	29	33	29	50	54	50
13	70	74	53	21	28	21	56	52	46
14	77	62	73	33	22	19	52	52	45
15	82	76	78	41	31	35	55	54	47
16	56	63	68	13	28	32	48	49	40
17	79	54	63	39	36	33	46	43	41
18	63	72	60	40	43	33	52	54	52
19	48	51	49	16	16	19	55	48	44
20	39	51	53	30	27	31	46	51	50
21	74	76	76	36	39	35	61	58	59
22	68	67	46	29	34	20	40	45	38
23	81	81	70	45	38	37	50	55	32
24	78	77	78	36	35	32	47	54	35
25	68	68	64	30	34	30	37	51	39
26	65	33	50	34	20	29	48	39	43
27	57	68	48	35	42	30	56	44	50
28	53	67	34	26	41	16	54	50	41
29	56	42	65	23	18	29	51	46	54
30	60	64	72	33	31	32	53	52	59

Tabela 12: Dados, em porcentagem, dos valores dos parâmetros espermáticos motilidade total por ejaculado, das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob as curvas C1, C2 e C3 da máquina de congelação TK 3000 e seus respectivos grupos controle (GC), congelados em caixa de isopor.

Motilidade total								
Ejac.	GC	C1	Ejac.	GC	C2	Ejac.	GC	C3
4	79	74	22	68	74	13	70	70
3	76	75	23	81	84	14	77	76
2	84	82	24	78	76	15	82	78
1	68	67	25	68	74	16	56	55
5	64	64	26	65	59	17	79	75
6	69	60	27	57	78	18	63	63
7	63	67	28	53	81	19	48	53
8	68	60	29	56	52	20	39	65
9	62	69	30	60	56	21	74	69
10	71	64	31	60	60	34	60	60
11	72	63	32	50	62	35	63	63
12	65	65	33	60	56	36	48	53

Tabela 13: Dados, em porcentagem, da avaliação dos parâmetros espermáticos motilidade progressiva por ejaculado, das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob as curvas C1, C2 e C3 da máquina de congelação TK 3000 e seus respectivos grupos controle (GC), congelados em caixa de isopor.

Motilidade Progressiva								
Ejac.	GC	C1	Ejac.	GC	C2	Ejac.	GC	C3
1	38	39	22	45	45	13	21	26
2	42	45	23	36	29	14	33	33
3	50	39	24	30	30	15	41	36
4	33	29	25	34	26	16	21	26
5	30	24	26	35	49	17	39	36
6	32	25	27	26	35	18	40	33
7	30	29	28	23	24	19	21	26
8	36	28	29	33	29	20	30	34
9	25	25	30	34	53	21	36	35
10	30	30	31	33	29	34	29	36
11	54	51	32	35	40	35	33	33
12	29	20	33	33	29	36	36	35

Tabela 14: Dados, em porcentagem, dos valores dos parâmetros espermáticos de integridade de membrana plasmática por ejaculado, das amostras descongeladas obtidas através da congelação sob as curvas C1, C2 e C3 da máquina de congelação TK 3000 e seus respectivos grupos controle (GC), congelados em caixa de isopor.

Integridade de Membrana								
Ejac.	GC	C1	Ejac.	GC	C2	Ejac.	GC	C3
1	50	49	22	42	53	13	40	42
2	54	51	23	30	33	14	61	53
3	45	41	24	53	48	15	46	54
4	39	40	25	51	49	16	46	54
5	49	43	26	54	58	17	45	49
6	51	48	27	56	59	18	52	48
7	40	36	28	48	46	19	46	38
8	43	48	29	37	43	20	48	53
9	50	43	30	47	41	21	55	54
10	55	55	31	50	57	34	52	53
11	53	52	32	40	50	35	56	52
12	51	47	33	37	43	36	40	42

Tabela 15: Dados da avaliação dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT) e progressiva (MP), por ejaculado, das amostras seminais refrigeradas a 5°C por 3 horas no sistema de transporte refrigerado Botutainer®.

Ejaculado	MT	MP
1	62	29
2	63	27
3	68	34
4	43	17
5	50	22
6	75	33
7	66	30
8	75	35

Tabela 16: Dados, em porcentagem, dos parâmetros espermáticos de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (IMP) por ejaculado, das amostras seminais descongeladas, obtidas através da congelação sob as curvas dos grupos G2 e G3 das máquinas de congelação TK3000 e do grupo controle “GC”, congelado em caixa de isopor

Ejac.	MT			MP			IMP		
	GC	G2	G3	GC	G2	G3	GC	G2	G3
1	54	69	60	28	35	27	60	57	42
2	11	18	15	6	11	10	12	15	12
3	65	72	66	26	46	28	42	62	57
4	14	21	27	3	6	7	20	20	26
5	72	81	70	38	48	29	52	54	57
6	12	25	18	3	6	3	15	28	25
7	16	18	18	3	4	4	20	20	15
8	56	78	69	20	35	26	51	47	58