

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TAXAS DE
CONGELAÇÃO E VOLUMES DE ARMAZENAMENTO
DE SÊMEN NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA EM
GARANHÕES DE ALTA E BAIXA CONGELABILIDADE**

ROSIÁRA ROSÁRIA DIAS MAZIERO

BOTUCATU – SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TAXAS DE
CONGELAÇÃO E VOLUMES DE ARMAZENAMENTO DE
SÊMEN NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA EM GARANHÕES DE
ALTA E BAIXA CONGELABILIDADE**

ROSIÁRA ROSÁRIA DIAS MAZIERO

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

BOTUCATU – SP

2010

Nome do Autor: Rosiára Rosária Dias Maziero

Título: COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TAXAS DE CONGELAÇÃO E VOLUMES DE ARMAZENAMENTO DE SÊMEN NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA EM GARANHÕES DE ALTA E BAIXA CONGELABILIDADE.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. José Antônio Dell’Aqua Júnior

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof.Dr. Rubens Paes de Arruda

Membro

FMVZ – USP – Pirassununga/SP

Data da Defesa: 01 de Julho de 2010.

*Dedico este trabalho aos meus
pais, Mauro e Rosaly, ao meu irmão
Ralf e ao Gustavo, que sempre me
apoiaram, motivaram e me deram a
força necessária para continuar a
busca pela realização de todos os
meus sonhos...*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me dar saúde, por colocar pessoas tão especiais em meu caminho, por me orientar nas escolhas certas, por me dar forças nos momentos mais difíceis e por fazer possível a realização de cada conquista.

Ao **Professor Doutor Frederico Ozanam Papa** por me aceitar como sua orientada, em um momento tão complicado de minha carreira profissional, por me incentivar a continuar o meu mestrado, pelas broncas, pelos momentos agradáveis e por ser meu amigo!

Ao **Professor Doutor Roberto Sartori Filho** pela orientação, ensinamentos, por acreditar em meu potencial e pela sua amizade! Aqui deixo expressa minha eterna admiração e gratidão!

Ao **Professor Doutor João Carlos Pinheiro Ferreira** pela amizade, pelos ensinamentos desde o início da minha carreira acadêmica, pelas orientações em minhas Iniciações Científicas, por ser meu grande amigo em todas as horas decisivas, muito obrigada!

Ao **Professor Doutor Sony Dimas Bicudo** pelo exemplo de bondade e dedicação, por sua amizade, pela sua paciência como educador e por sua extrema sabedoria.

Ao **Professor Doutor Nereu Carlos Prestes**, amo você!

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária: **Professora Doutora Maria Denise Lopes, Professora Doutora Eunice Oba, Professora Doutora Fernanda da Cruz Landin e Alvarenga, Professor Doutor Cezinande Meira, Professor Doutor Marco Antonio Alvarenga** por todos os

ensinamentos durante a minha graduação, residência e durante o meu mestrado, muito obrigada!

Aos meus queridos amigos **Maria Clara Costa Mattos (Dáni)**, **Carmo Emanuel Almeida Biscarde** e **Gabriel Augusto Monteiro**. Muito obrigada por vocês terem feito o ano de Residência o melhor ano da minha vida! Por serem companheiros em todos os momentos, pela amizade, pelo respeito e por fazerem desse ano, um período tão divertido e de um aprendizado extremo!

Aos meus **queridos amigos da XXXIX Turma de Medicina Veterinária** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. A todos vocês que fazem parte da minha vida! Em especial a **Silvia Schaaf (Tuxa)**, **Liliane Celita (Malzinha)**, **Marcella Sanches (Moco)**, **Carolina Balarini Zetun (Xups)**, **Paulo Carnicelli (Sodo)**, **Luis Fernando Negro Silva (Tenesmo)**, **Letícia Curvelo (Minrosca)**, **Claudia Dias Monteiro (Tragédia)**, **Hugo Toma (Marrento)**, **Laura Lorenzetti Jorge (Trepadeira)** e **Marcel Cavalcanti Farras (Braxola)**, saudades sempre!

Ao meu amigo **Mateus Mioni (Dumbo)** que se tornou uma pessoa indispensável no início da minha vida profissional. Muito obrigada por todo companheirismo, por ter paciência em me ensinar uma nova vida longe de casa e por ser essa pessoa tão amiga e especial.

Aos amigos e pós-graduandos **Priscilla Nascimento Guasti**, **Bruno Ribeiro Avanzi** e **Gabriel Augusto Monteiro** por toda ajuda durante a fase experimental, saibam que sem vocês não teria conseguido realizar meu experimento. Muito obrigada por toda amizade, paciência e dedicação!

Ao meu amigo **Ulisses Stelmann** pelo exemplo de disciplina e dedicação em tudo o que faz, pelos momentos de descontração e amizade. Muito obrigada!

Ao meu amigo **Ian Martin** pela amizade, pelo apoio e por ser meu eterno orientador. Torço pelo seu sucesso e por sua felicidade. Obrigada por tudo!

Aos amigos da **Sexing Technologies do Brasil**, meu local de trabalho, de longos e extensos turnos, em especial ao Evanil Pires de Campos, Osvaldo Teobaldo, Priscilla e Fernanda Tanno, Viviane Guidi, Renata Guidi, Camila Luporini, Fernando Prestes, Murilo Flamini, Claudia Fernandes Raphael, Thaís Rose Hamilton, Mateus Mioni e Janeth Rosendo! Obrigada por me apoiarem na realização deste sonho!

Ao médico veterinário **Dr. José Carlos Martin** e aos demais funcionários do **Haras Itapuã** por ceder as éguas para a realização do teste de fertilidade dos animais e por toda disponibilidade de ensinamentos e atenção.

A **Professora Doutora Luzia Trinca** por realizar a análise estatística do meu experimento.

A todos os **amigos pós-graduandos** em especial a Ana Augusta Pagnano Derussi e André Maciel Crespilho que colaboraram para que fosse possível a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Aos **funcionários do Departamento de Reprodução Animal** Valter, Cristina, Edilson, Zé, Tico (*in memorian*), Márcio e Raquel muito obrigada por toda ajuda!

A **Biotech Botucatu** por ceder todos os equipamentos e meios de congelação, em especial ao Dr. José Antonio Dell'Aqua Júnior.

A **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro na compra de materiais e equipamentos.

A **TK Equipamentos para Congelação** por ceder a máquina de congelação, equipamento fundamental para a realização deste trabalho.

A todos os **meus familiares**, minha avó Rosinha, avó Cida, todos os meus tios, tias, primos, primas, amo muito vocês e obrigada por tudo!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema simplificado do processamento do sêmen equino criopreservado.....	17
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Parâmetros espermáticos de Motilidade Total (MT, %) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas francesas.....	30
Gráfico 2-	Parâmetros espermáticos de Motilidade Progressiva (MP, %) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas francesas.....	30
Gráfico 3-	Parâmetros espermáticos de Velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas francesas.....	31
Gráfico 4-	Parâmetros espermáticos de velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas francesas.....	31
Gráfico 5-	Parâmetros espermáticos de velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas francesas.....	32
Gráfico 6-	Parâmetros espermáticos de deslocamento lateral de cabeça (AHL, μm) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas francesas.....	32
Gráfico 7-	Parâmetros espermáticos de percentagem de espermatozóide rápidos (RAP, %) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas francesas.....	33

Gráfico 8-	Parâmetros espermáticos de percentagem de espermatozóides médios (MED, %) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas francesas.....	33
Gráfico 9-	Parâmetros espermáticos de integridade de membrana plasmática (IMP, %) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas francesas.....	34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Médias com respectivos erros padrão das variáveis analisadas pós-descongelamento de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), percentagem de espermatozoides rápidos (RAP, %) e integridade de membrana plasmática (IMP, %) nos diferentes protocolos de congelamento..... 22
- Tabela 2-** Médias com respectivos erros padrão das variáveis analisadas pós-descongelamento de velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$)..... 23
- Tabela 3-** Médias e erro padrão das características do movimento espermático avaliados pelo sistema CASA e pela microscopia de epi-fluorescência de sêmen equino congelado em palhetas francesas de 0,5 e 0,25 mL..... 24
- Tabela 4-** Médias com os respectivos desvios padrão das variáveis analisadas pós-descongelamento do ganhão A (alta congelabilidade) e do ganhão B (baixa congelabilidade) nas amostras criopreservadas para a realização do teste de fertilidade..... 36

Tabela 5-	Médias com os respectivos desvios padrão das variáveis analisadas pós-descongelação dos animais C (baixa congelabilidade) e dos animais D (alta congelabilidade) nas amostras criopreservadas para a realização do teste de fertilidade.....	38
Tabela 6-	Efeito do protocolo de congelação utilizado sobre o efeito do ganhão.....	39
Tabela 7-	Taxa de Concepção em percentagem (%) nos três sistemas de congelação utilizados: caixa de isopor, máquina TK® 4000 C e máquina Mini Digitcool®.....	39
Tabela 8-	Descrição dos ganhões utilizados no teste de fertilidade, número de inseminações realizadas e taxas de concepção obtidas.....	40
Tabela 9-	Efeito do protocolo de congelação e do ganhão sobre as taxas de concepção.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micrômetro
ALH	amplitude lateral de cabeça
ANOVA	análise de variância
BCF	frequência de batimentos flagelar
Ca^{2+}	íon cálcio
CASA	Computer-Assisted Semen Analysis – Análise Computadorizada do
Sêmen	
CFDA	diacetato de carboxifluoresceína
CX	caixa de isopor
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
g	grama
g	gravidade
Hz	Hertz
IA	inseminação artificial
LIN	linearidade
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro

mM	milimolar
M	molar
M1	máquina TK 4000C
M2	máquina Mini Digitcool
MT	motilidade total
MP	motilidade progressiva
Nm	nanômetro
O ₂	oxigênio
OH ⁻	radical hidroxila
P	nível de significância
pH	concentração de íons de Hidrogênio
PI	iodeto de propídio
S	segundos
SAS	Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)
sptz	espermatozóides
STR	retilinearidade
TE	transferência de embrião
VAP	velocidade ao longo de uma trajetória média
VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	percentagem
x	vezes
10 ⁶	milhões
<	menor que
>	maior que
±	mais ou menos
-	menos/negativo
=	igual
®	marca registrada
:	para (1:100)
mOsm	miliosmol
™	trade mark

SUMÁRIO

RESUMO.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. <i>INTRODUÇÃO</i>	1
2. <i>REVISÃO DE LITERATURA</i>	3
2.1 Criopreservação do sêmen equino.....	3
2.1.1 Estrutura dos espermatozoides e da membrana plasmática.....	3
2.1.2 Princípios da criopreservação.....	4
2.1.3 Mecanismos de lesão celular decorrentes da criopreservação.....	5
2.1.4 Meios diluentes e crioprotetores.....	6
2.1.5 Concentração e Armazenamento do sêmen criopreservado.....	8
2.1.6 Taxas de congelamento.....	10
3. <i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	13
3.1 <i>Experimento 1</i>	13
3.1.1 Animais.....	13
3.1.2 Colheita dos ejaculados.....	14
3.1.3 Processamento e criopreservação das amostras.....	14
3.1.4 Descongelamento das amostras e avaliações espermáticas.....	18
3.1.5 Análise estatística.....	18
3.2 <i>Experimento 2</i>	18
3.2.1 Animais.....	18
3.2.2 Colheita do ejaculados.....	19
3.2.3 Processamento e criopreservação das amostras.....	19
3.2.4 Teste de fertilidade.....	19

3.2.5 Análise estatística.....	20
4. <i>RESULTADOS</i>	20
4.1 <i>Resultados – Experimento 1</i>	20
4.1.1 Efeito do volume de armazenamento.....	24
4.1.2 Efeito do protocolo de criopreservação.....	25
4.2 <i>Resultados – Experimento 2</i>	35
5. <i>DISCUSSÃO</i>	41
6. <i>CONCLUSÃO</i>	45
7. <i>REFERÊNCIAS</i>	46
8. <i>ANEXOS</i>	54
9. <i>TRABALHO CIENTÍFICO</i>	59

MAZIERO, R. R. D. **Comparação entre diferentes taxas de congelação e volumes de armazenamento de sêmen na viabilidade espermática em garanhões de alta e baixa congelabilidade.** Botucatu, 2010. 94p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

RESUMO

A criopreservação de sêmen equino mostra-se como importante instrumento no ganho genético de rebanhos pela maximização do uso de bons reprodutores. Porém, nos programas de inseminação artificial, a utilização de espermatozóides criopreservados apresenta índices de fertilidade inferiores aos obtidos com sêmen a fresco, constituindo um dos maiores entraves à plena difusão dessa biotecnologia. Assim, o experimento 1 teve como objetivo avaliar o movimento espermático pelo sistema computadorizado (CASA) e a integridade da membrana plasmática por microscopia de epi-fluorescência de espermatozóides equino congelados em palhetas de 0,5 e 0,25 mL, em diferentes taxas de congelação na viabilidade espermática. Para desenvolver o projeto foram utilizadas três metodologias de congelação: o método convencional em caixa de isopor e dois equipamentos automatizados, um deles a máquina Mini Digitcool® (IMV - Technologies - França), que possibilita uma variação de -10°C a -60°C por minuto e o outro equipamento TK® 4000C (TK Equipamentos para Congelamento) que possibilita uma variação de -10°C a -40°C por minuto. Para tanto foram utilizados 3 ejaculados de 4 garanhões de diferentes raças, para cada protocolo de congelamento, sendo o protocolo 1: caixa de isopor x máquina TK® 4000C na taxa de -20°C/min x máquina Mini Digitcool® na taxa de -20°C/min; protocolo 2: caixa de isopor x máquina TK® 4000C na taxa de -40°C/min x máquina Mini Digitcool® na taxa de -40°C/min e protocolo 3: caixa de isopor x máquina TK® 4000C na taxa de -40°C/min x máquina Mini Digitcool® na taxa de -60°C/min. Para a análise pós-descongelamento as palhetas de 0,5 mL foram descongeladas a 46°C por 20 segundos e as palhetas de 0,25 mL a 46°C por 15 segundos. A análise estatística das variáveis estudadas no sêmen congelado/descongelado foi realizada mediante o pacote SAS 9.1. Inicialmente, empregou-se o programa R de análise descritiva Box Plot. Em seguida, os dados foram analisados mediante o programa Proc. MIXED, uma análise de variância, para investigar o efeito do tratamento, ou seja, as taxas de congelamento e as palhetas utilizadas, considerando o efeito animal como aleatório. Adotou-se um nível de

probabilidade de 0,05 para diferenças estatisticamente significativas. Não houve efeito de interação entre as metodologias de congelamento utilizadas e as taxas de congelamento, entretanto foram observadas diferenças estatísticas entre os dois volumes de armazenamento de sêmen. As palhetas de 0,5 mL apresentaram parâmetros de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) e percentagem de espermatozoides rápidos (RAP, %) superiores aos parâmetros encontrados em palhetas de 0,25 mL. Já no experimento 2 foi realizado o teste de fertilidade dos ejaculados de garanhões de alta e baixa congelabilidade, seguindo o protocolo 2 para congelamento das amostras. Foram inseminadas 35 éguas clinicamente saudáveis, tanto nulíparas como múltíparas, com ciclo estral monitorado por ultrassonografia. Após os folículos atingirem 35 mm, a ovulação foi induzida com 1 mL (intra muscular) de acetato de deslorelina (GnRH). Após 36 horas, as éguas foram monitoradas a cada 6 horas até comprovada a ovulação e em seguida inseminadas com 800×10^6 milhões de espermatozoides totais. O diagnóstico de gestação foi realizado 15 dias após a ovulação, com auxílio do ultrassom. Para avaliação dos índices de fertilidade entre os garanhões e metodologias de congelamento realizou-se análise de regressão logística empregando-se o Proc GENMOD do pacote SAS 9.1. Adotou-se um nível de probabilidade de 0,05 para diferenças estatisticamente significativas. Não foram encontradas diferenças entre as metodologias de congelamento e as taxas de prenhez obtidas, sendo que para a caixa de isopor a taxa foi de 58,33 %, para a máquina TK® 4000C foi de 61,54 % e para a máquina Mini Digitcool® o índice de gestação foi de 50,0 %. Assim, a metodologia convencional em caixa de isopor mostrou-se similar a metodologias em máquinas automatizadas em taxas lentas e rápidas de congelamento, as amostras de sêmen equino criopreservadas em palhetas de 0,5 mL apresentaram qualidade seminal superior a palhetas de 0,25 mL e os índices de fertilidade, tanto de garanhões de alta como de baixa congelabilidade alcançaram índices satisfatórios de prenhez, com relação aos dados encontrados na literatura científica.

Palavras-chave: Equino. Sêmen. Criopreservação. Volume. Taxa de congelamento.

MAZIERO, R. R. D. Comparison of different freezing rates and semen storage volume on sperm viability of poor and good freezer stallions. Botucatu, 2010. 94p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Equine semen cryopreservation comes as an important tool to enhance the herd gene pool by maximizing the use of the top genetic merit stallions. However, the use of frozen semen in the artificial insemination programs presents reduced fertility rates in comparison to those obtained with fresh semen, being one of the biggest hindrances to spread this biotechnology. Thus, Experiment 1 aimed to evaluate the motility pattern using a computer-assisted sperm analysis (CASA) and plasma membrane integrity by epifluorescence microscopy of equine semen that were frozen in 0.5 and 0.25mL straws at different freezing rates and their relationship with sperm viability. Three different methodologies were used: conventional method with isothermic box and two automated systems: the Mini Digitcool® machine (IMV - Technologies - France), which allows a range from -10°C to -60°C per minute, and the TK® 4000C (TK Equipamentos para Congelação, Brazil), that provides a range from -10°C to -45°C per minute. Therefore 3 ejaculates for 4 animals were used for each freezing protocol. On protocol 1 we compared isothermic box vs. TK® 4000C machine at a -20°C/min rate vs. Mini Digitcool® at a -20°C/min rate; Protocol 2 compared isothermic box vs. TK® 4000C machine at a -40°C/min rate vs. Mini Digitcool® at a -40°C/min rate; and Protocol 3 compared isothermic box vs. TK® 4000C machine at a -40°C/min rate vs. Mini Digitcool® at a -60°C/min rate. The 0.5mL-straw samples were thawed at 46°C/20 sec whereas samples from the 0.25mL straws were thawed at 46°C/15 sec for post-thawing analysis. Statistical analysis from the frozen-thawed semen evaluated parameters was performed using the statistics software SAS 9.1. At first, it was used the descriptive analysis Box Plot R program. Then, data were analyzed using Proc. MIXED, a variance analysis to investigate the treatment effect (freezing rates and straw sizes), considering the animal as a random effect. Statistical significance was set at $p < 0.05$. There was no interaction effect between freezing methodologies and freezing rates, however, statistical differences were observed between the two straw volumes. The 0.5mL straws presented superior values for total motility (TM, %), progressive motility (PM, %),

angular progressive velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), progressive velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), track speed (VCL, $\mu\text{m/s}$) and percentage of rapid sperm (RAP, %) when compared to values from 0.25mL straws. In experiment 2, fertility trial was performed according to the freezing protocol 2, using stallions considered as good and poor freezers. Thirty-five clinically healthy nulliparous and multiparous mares that had their estrus cycle monitored by US were inseminated. Ovulation was induced with 1mL of deslorelin acetate (GnRH) intramuscularly injection, when a 35mm follicle was detected. 36 hours later, mares were monitored every 6 hours until ovulation was detected. When it was detected, mares were inseminated with 800×10^6 total sperm. Pregnancy was confirmed via ultrasound examination 15 days after ovulation. In order to assess fertility rates among stallions and freezing methodologies it was performed logistic regression using the Proc GENMOD from SAS 9.1. Significance was set at $p < 0.05$. There was no significant difference between the freezing methodologies and the obtained pregnancy rates. Pregnancy rates were 58.33%, 61.54% and 50% for the isothermic box, TK® 4000C and Mini Digitcool® respectively. Hence, the conventional method using isothermic box was similar to the automated machines in low and fast freezing rates, and samples frozen in 0.5mL straws presented superior seminal quality from those frozen in 0.25mL straws. Fertility rates, for both good and poor freezer stallions reached satisfactory pregnancy rates in relation to the results found in scientific literature.

Key words: Equine. Semen. Cryopreservation. Volume. Freezing rate.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países que mais geram produtos utilizando biotecnologias da reprodução (VIANA & CAMARGO, 2007), porém com resultados muito variáveis. Para isso, o desenvolvimento de técnicas para a preservação e estocagem de sêmen possibilita o melhor aproveitamento de animais geneticamente superiores, favorece o armazenamento de material genético daqueles animais ameaçados de extinção, além de permitir o transporte de sêmen a longas distâncias e controlar as doenças sexualmente transmissíveis.

Para a maximização do desempenho dos machos, as biotécnicas envolvendo a criopreservação do sêmen equino vem ganhando destaque por propiciarem, além de um banco genético de fácil acesso, a total utilização de machos que apresentam boas características tanto para a reprodução como para o desempenho atlético.

Entretanto, os danos provocados pela criopreservação são irreversíveis à integridade estrutural, bioquímica e biofísica da célula espermática resultando assim, em menores taxas de fertilidade (AURICH, 2008). Desse modo, métodos que evitem ao máximo lesões à célula espermática são aprimorados desde a descoberta do efeito crioprotetor do glicerol por Polge et. al., (1949).

Além dos crioprotetores, a taxa de refrigeração, congelação e descongelação são fatores determinantes para a difusão desta biotecnologia e contribuem para uma menor variabilidade nas taxas de prenhez (METCALF, 2007). Assim, sistemas automatizados de controle da queda de temperatura durante o processo de criopreservação vêm sendo desenvolvidos, todavia ainda apresentam custo elevado e de difícil manipulação, principalmente pela maioria dos aparelhos não serem portáteis.

Outro fator importante que interfere na viabilidade espermática é a variação individual entre os ganhões. Para alguns animais, mesmo aplicando os cuidados necessários durante todo o procedimento, os espermatozoides que sobrevivem ao processo de criopreservação são insuficientes para garantir um adequado potencial de fertilidade (BRINSKO et al., 2000). No levantamento realizado por Alvarenga et al. (1996), ficou claro a existência dos fatores racial e individual relacionados com resistência à congelação na espécie equina. Raças de salto (Hannoveriano, Holstainer e Trackner) apresentaram uma porcentagem maior de indivíduos tolerantes à criopreservação (80%) em relação às raças Mangalarga e Mangalarga Marchador (15%). Estima-se também que 20% dos ganhões são bons congeladores, 60%

apresentam índices aceitáveis para congelação e 20% congelam mal (VIDAMENT et al., 1997).

A sanidade reprodutiva das éguas, a qualidade do sêmen utilizado e o manejo reprodutivo para a cobertura também são de fundamental importância para que os resultados dos programas de inseminação artificial (IA) e de transferência de embriões (TE) com sêmen congelado equino obtenham o sucesso.

No entanto, a utilização do sêmen criopreservado equino ainda apresenta menores taxas de fertilidade quando comparadas aos resultados de sêmen fresco ou resfriado (SAMPER & MORRIS, 1998; WATSON, 2000). Desse modo, com o intuito de maximizar a utilização do sêmen equino congelado e diminuir os danos provocados pelo processo de criopreservação, melhorando as taxas de fertilidade, vários protocolos vêm sendo desenvolvidos e testados, como a combinação de diferentes volumes de armazenamento e diferentes taxas de congelação. Apesar de muitas pesquisas procurarem a melhor combinação de ambos, ainda não se tem ao certo o melhor protocolo para a criopreservação do sêmen (NASCIMENTO et al., 2008).

Por outro lado, a avaliação do potencial de fertilidade de uma amostra de sêmen é de grande valia para o emprego destas biotécnicas de reprodução. Entretanto, o alto custo e o consumo de tempo das avaliações, aliado a complexidade e dependência da estabilidade laboratorial imposta pelos diversos métodos de análise tornam impraticável a adoção de tais métodos na rotina comercial das diversas espécies (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005; MORRELL et al., 2010).

Assim, este trabalho teve como objetivo comparar a viabilidade espermática de garanhões de alta e baixa congelabilidade em diferentes taxas de congelação, em metodologia convencional em caixa de isopor, nos aparelhos automatizados nacional TK® 4000 C (TK Tecnologia em Congelamento Ltda, Uberaba, Minas Gerais, Brasil) e em equipamento importado Mini Digitcool® ZH 400 (IMV Technologies, França), nas palhetas francesas de 0,5 e 0,25mL (Experimento 1). Adicionalmente, o experimento 2 teve como objetivo comparar o protocolo de congelação e a fertilidade dos espermatozoides em um esquema de inseminação pré-determinado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Criopreservação de sêmen eqüino

2.1.1 Estrutura dos espermatozóides e membrana plasmática

Os espermatozóides foram descritos inicialmente por Leeuwenhoek há 330 anos (VARNER e JOHNSON, 2007). Originam-se de um processo denominado espermatogênese, a partir de células primordiais localizadas nos túbulos seminíferos.

Anatomicamente, os espermatozóides são divididos em cabeça e cauda. A forma, tamanho e estrutura da cabeça variam entre as espécies e contém o núcleo, o acrossomo e os componentes do citosólicos. A cabeça é subdividida em região acrossomal, segmento equatorial, região pós-acrossomal, anel posterior, o qual é delimitado pela junção entre a cabeça e o flagelo. Já a cauda dos espermatozóides pode ser dividida em quatro regiões distintas: o colo ou peça de conexão, a peça intermediária, a peça principal e a peça terminal, todas envolvidas por uma mesma membrana (BARTH e OKO, 1989; VARNER e JOHNSON, 2007).

A membrana plasmática envolve todo o espermatozóide e é formada por uma bicamada lipídica, contendo fosfolipídios, colesterol, glicolipídios e diferentes tipos de proteínas organizados em modelo de mosaico fluído. Esta fluidez da membrana é fundamental para que a todas as suas funções sejam realizadas de forma plena. Desse modo, as composições relativas entre fosfolipídios e colesterol e a temperatura durante o processo de criopreservação são os principais fatores que alteram a integridade das células (ALBERTS et al., 1997).

Os fosfolipídios, cujas cadeias de ácidos graxos são predominantemente poliinsaturadas, quando submetidos à redução da temperatura, assumem uma forma cônica, na qual as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas. Essa estrutura é denominada de forma “hexagonal II” ou micela invertida. Quando a membrana está em transição da fase fluída/cristalina para a fase gel, para muitos lipídios, a formação dessa micela invertida é transitória; entretanto, para certos fosfolipídios, esta estrutura persiste. Como consequência, tem-se aumento da permeabilidade da membrana com o estabelecimento de canais que permitem a entrada

de íons e pequenas moléculas, podendo desestabilizar a membrana, causando danos irreparáveis e perda de viabilidade (SQUIRES et al., 1999; WATSON, 2000).

2.1.2. Princípios da criopreservação

No processo de criopreservação, o sêmen é inicialmente refrigerado à temperatura ambiente, ou seja, de 37°C a 20°C, o que parece não ocasionar maiores danos aos espermatozóides. Entretanto, o estresse inicial acontece quando os espermatozóides passam da temperatura corporal para 5°C, característico da fase de transição na qual a membrana plasmática passa do estado líquido cristalino para o estado gel (GRAHAM, 1996).

Se o processo de refrigeração é realizado de modo inadequado, acontece o choque térmico. Este fenômeno acarreta a danos parcialmente irreversíveis a célula espermática o qual se caracterizam por movimento anormal (circular ou retrógrado), perda rápida de motilidade, lesões no acrossomo, danos a membrana plasmática, redução do metabolismo e perda de componentes intracelulares (GRAHAM, 1996).

Durante o processo de congelação, a suspensão de espermatozóides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelação do meio, conhecido como super resfriamento, antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar, ocorre um aumento na temperatura que é necessário para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para o espermatozóide, sendo minimizado pelo uso de taxas adequadas de congelação e de meios crioprotetores (GRAHAM, 1996; SQUIRES, 1999, MEDEIROS, 2007).

A faixa crítica de temperatura para os espermatozóides é em torno de -3° C e -10° C, neste momento ocorre a formação de cristais de gelo e liberação do calor latente de fusão, o qual acarreta um aumento de temperatura do sistema e as maiores injúrias celulares. Sendo assim, a velocidade de congelação neste período deve ser o mais rápido possível (WATSON, 2000; CHAVEIRO et al., 2006).

Durante este intervalo, ocorre uma mudança no gradiente osmótico entre os meios intra e extracelular, alterando o equilíbrio e desse modo acontece a desidratação celular. Neste ponto, a taxa de congelação deve ser lenta, para evitar a congelação da água intracelular. A perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, por reduzir a probabilidade de se formarem grandes canais de gelo intracelulares que causam danos as estruturas internas, assim como à membrana plasmática (SQUIRES, 1999). No

entanto, a desidratação severa promove a desnaturação de macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, levando ao colapso da membrana plasmática (MEDEIROS, 2007).

2.1.3 Mecanismo de lesão celular decorrentes da criopreservação

O processo de criopreservação provoca uma redução da viabilidade espermática devido a lesões nas membranas, principalmente na plasmática, acrossomal externa e a mitocondrial (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009). A desestabilização da membrana plasmática após a congelação assemelha-se a uma capacitação fisiológica do espermatozóide, desse modo o espermatozóide capacitado e/ou com o acrossomo reagido tem uma vida limitada (WATSON, 2000).

Durante a criopreservação os espermatozóides são expostos a variações extremas de temperatura e osmolaridade. Neste momento, ocorre a formação de cristais de gelo com aumento das concentrações de soluto no meio extracelular elevando a osmolaridade. Assim, as células perdem água para manter o equilíbrio entre o meio intra e extracelular. Quando, novamente estas células são expostas a meios isotônicos, como acontece na descongelação ou mesmo, quando entram em contato com secreções do trato reprodutivo das fêmeas, ocorre uma entrada de água na célula (MEDEIROS, 2007).

As alterações decorrentes do choque térmico ocorrem durante a fase de transição, a qual é caracterizada pela passagem da membrana plasmática do estado líquido/cristalino para a fase gel, devido à alteração na forma das moléculas de fosfolipídios induzidos pela refrigeração (AMANN e PICKETT, 1987). Essas alterações impossibilitam os fosfolipídios de se moverem lateralmente, resultando na formação de domínios cristalinos, com pequenas regiões de lipídios no estado líquido onde ficam aderidas as proteínas. Esta agregação protéica resulta no aumento da permeabilidade da membrana e decréscimo da atividade metabólica (HAMMERSTED et al., 1992).

Assim, alterações bruscas de temperatura durante o processo de criopreservação devem ser evitadas, pois as mudanças graduais na membrana plasmática e de fluxos iônicos conferem maior resistência às células durante a congelação. Da mesma forma, os fosfolipídios da gema de ovo (componente do diluidor), interagem com os lipídios da membrana dos espermatozóides conferindo-lhes maior resistência ao choque térmico e

auxílio na preservação da integridade celular durante a preservação do sêmen (WATSON, 2000).

2.1.4 Meios diluidores e crioprotetores

Os meios diluidores são constituídos de substâncias que preservam a membrana plasmática, mediante a estabilização do pH do meio, neutralização dos produtos tóxicos produzidos pelos espermatozóides, proteção contra o choque térmico, manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico, inibição do crescimento bacteriano e fornecimento de energia (FURST, 2006).

Sendo assim, a presença de algumas substâncias como os açúcares, lipoproteína da gema do ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos, no meio diluidor alteram as propriedades físicas da solução no processo de congelação e também promovem proteção aos espermatozóides quanto à formação de cristais de gelo intracelular, desidratação excessiva da célula, danos osmóticos e oxidativos (WATSON, 2000).

Desse modo, os crioprotetores são classificados em penetrantes e não-penetrantes e devem proteger os espermatozóides tanto no processo de congelação como na descongelação. O glicerol é um crioprotetor penetrante e é o mais utilizado na congelação de sêmen de garanhões, uma vez que atua na proteção das estruturas celulares, tanto intra como extracelular, aumentando o número de canais de solvente que permanecem não congelados e dilui as altas concentrações de sal. Já os crioprotetores não-penetrantes como a lactose e as lipoproteínas presentes na gema de ovo, atuam somente no meio extracelular (GRAHAM, 1996).

Durante décadas diluentes e seus constituintes têm sido estudados e testados na congelação de sêmen de garanhões com resultados bastante variáveis em relação resultados laboratoriais de viabilidade espermática e índices de fertilidade (MEDEIROS, 2007).

Os crioprotetores mais utilizados para congelação de sêmen equino são: o glicerol, etilenoglicol, DMSO e as amidas, sendo o glicerol o crioprotetor mais utilizado nos meios de congelação em concentrações de 2 a 5%. No entanto, trabalhos demonstram um efeito deletério do glicerol ao espermatozóide de diferentes espécies. Estes efeitos tóxicos do glicerol têm sido reportados por ocasionar desnaturação de proteínas, alterarem as interações da actina e induzir a liberação das proteínas do seu local na membrana (FAHY et al., 1990).

A gema de ovo no meio crioprotetor beneficia os espermatozóides por manter a pressão coloidal do meio e também a lipoproteína de baixa densidade, contida na gema, estabiliza a membrana espermática durante a congelação e descongelação (WATSON, 2000). Holt (2000) revisou os aspectos relacionados à congelação de sêmen e relatou que os efeitos crioprotetores da gema de ovo estão envolvidos com a porção lipoprotéica de baixa densidade a qual protege as células espermáticas do choque térmico, da fase de transição dos lipídeos e danos a membrana plasmática a temperaturas abaixo do ponto de congelação da solução.

Constituintes do leite também desempenham importante papel na criopreservação de espermatozóides. As proteínas do leite exercem um papel na criopreservação semelhante a da gema de ovo. A eficiência dos meios diluentes à base de leite tem sido atribuída à sua composição protéica que atua como tampão e a propriedade quelante frente a metais pesados (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Muitos autores relatam a importância da interação entre as formulações de diluidores com substâncias crioprotetoras melhorando o desempenho das células espermáticas nas avaliações laboratoriais e em testes de fertilidade (ARRUDA, 2000; PAPA et al., 2002).

Existe uma grande variação entre os crioprotetores, sendo assim, Arruda (2000) evidenciou uma interação entre meio diluidor de congelação e o crioprotetor. Durante este estudo, foram utilizados os meios de congelação Lactose – EDTA – gema de ovo, INRA82 e meio a base de leite desnatado e os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. Quando se utilizou o meio diluente Lactose – EDTA - gema de ovo, os crioprotetores não apresentaram diferenças estatísticas entre as avaliações efetuadas, contudo com a utilização dos meios INRA82 e do meio diluente de congelação a base de leite o etilenoglicol houve uma tendência de melhoria nos parâmetros avaliados.

Na busca de novas alternativas de substâncias crioprotetoras para congelação do sêmen equino, Keith (1998) avaliou várias formas de amidas (formamida, metilformamida, dimetilformamida, acetamida e metilacetamida) como agentes crioprotetores em comparação ao glicerol e observou que a metilformamida (0,9 M) foi superior em manter a motilidade total dos espermatozóides de garanhões no tempo 0 pós-descongelamento em relação ao glicerol 0,55 M (54,2% a 51,6% respectivamente) e no tempo 20 (minutos) pós-descongelamento a metilformamida 0,6 M também foi superior ao glicerol 0,55 M (50,6% a 41,7% respectivamente.), em relação a motilidade progressiva a metilformamida 0,9 M no tempo 0 foi superior ao Glicerol 0,55 M (34,8%

a 29,4% respectivamente) e no tempo 20 pós-descongelamento metilformamida 0,6 M foi mais eficiente do que o glicerol (30,0% a 23,3% respectivamente) e na preservação da viabilidade celular.

Graham (2000) também obteve resultados de motilidade inferiores ao glicerol ($p < 0,05$), utilizando os crioprotetores acetamida, metilacetamida, formamida, metilformamida, dimetilformamida na concentração de 0,55M (60, 8, 20, 5, 40 e 37% respectivamente). No entanto, em um segundo experimento em que se utilizou os crioprotetores etilenoglicol, metilformamida, dimetilformamida nas concentrações de 0,6 e 0,9M em comparação ao glicerol a 0,6M, o crioprotetor metilformamida a 0,9M obteve melhor motilidade em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$).

Alvarenga et al., (2005) relataram que esta característica dos crioprotetores a base de amida, em se adaptarem melhor como agentes crioprotetores para o sêmen de garanhões, que apresentam resultados insatisfatórios com o glicerol, possam estar relacionado à menor viscosidade das amidas em relação ao glicerol resultando em uma maior permeabilidade destes crioprotetores conseqüentemente diminuindo os riscos de estresse osmótico nas células espermáticas.

2.1.5 Concentração e armazenamento do sêmen criopreservado

Existem diversos métodos de envase de sêmen criopreservado relatados na literatura. Inicialmente, amostras de sêmen congelado equino eram mantidas na forma de *pellets* (MERKT et al., 1975). Posteriormente, foram mantidas em tubos de alumínio (LOVE et al., 1989) e macrotubos de 1,0, 2,5, 4,0 e 5,0 mL (MARTIN et al., 1979; PAPA et al., 1989; ARRUDA et al., 1994).

O início do uso de palhetas de plástico deu-se em 1940, na Dinamarca. Logo em seguida, as técnicas para o armazenamento do sêmen em palhetas foram desenvolvidas e aperfeiçoadas por Cassou e Jondet. Durante a década de 60, Cassou introduziu palhetas de policloreto de vinila, com diâmetro de 2,8 mm e volume de 0,5 mL, a qual substituiu palhetas de maior diâmetro. Em 1968, este mesmo estudioso, introduziu a palheta de 0,25 mL que permanece em uso até os dias atuais (STEVENSON et al., 2009).

Assim, espera-se que menores volumes de palheta tendem a proporcionar maior superfície de contato com o meio externo, o que permite maior uniformidade entre as células durante o processo de refrigeração, congelamento e descongelamento; enquanto que

menores concentrações espermáticas tendem a manter maior número de células viáveis, pois possuem maior quantidade de nutrientes por célula. É possível que ocorram interações entre a concentração espermática e o volume de armazenamento ou mesmo um efeito compensatório do aumento da concentração na diminuição do volume (NASCIMENTO et al., 2008).

No estudo em que se comparou o armazenamento do sêmen equino congelado em *pellets* (0,2 mL) e em macrotubo de 5 mL, observou-se que a motilidade total e percentagem de espermatozóides com acrossomos intactos foram semelhantes nos dois métodos de envase. Porém, como discussão destacou-se que a criopreservação em macrotubos possibilitava uma melhor manipulação da dose inseminante, além de evitar o contato direto dos espermatozóides com o nitrogênio líquido (VIERTH, 1979).

Em seguida, outros estudos mostraram que a congelção de sêmen em palhetas de menor volume ofereciam melhores parâmetros espermáticos pós-descongelção por possibilitarem uma maior área de superfície em relação ao volume, dessa forma uma taxa de refrigeração, congelção e descongelção mais uniformes (AMANN & PICKETT, 1987; LOOMIS & CLARK, 1998).

Valores de motilidade progressiva (%) e velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$) avaliadas por sistema computadorizado foram superiores em amostras de sêmen congeladas em meio à base de glicerol a 4% em palhetas de 0,5 mL comparadas a amostras congeladas em macrotubo de 2,5 mL, confirmando o fato de que amostras congeladas em menores volumes melhoram os parâmetros espermáticos (HEITLAND et al., 1996).

Em 2001, Dell'Aqua Jr. et al. compararam o armazenamento de sêmen equino congelado em palhetas de 0,5 e 0,25 mL com taxa de descongelção a 38°C por 40 segundos e 38°C por 30 segundos, respectivamente e encontraram melhores parâmetros espermáticos quando da utilização de palhetas de 0,25 mL. Porém, com a realização do teste de fertilidade foram encontradas maiores taxas de prenhez no grupo de éguas inseminadas com sêmen envasado em palhetas de 0,5 mL, na concentração de 150×10^6 spztz pós-ovulação.

Com relação à concentração espermática por palheta, autores sugeriram ser provável que a qualidade seminal pós-descongelção esteja diretamente relacionada com a quantidade de agentes crioprotetores por unidade de volume (ANGOLA et al., 1992). Entretanto, Papa et al. (1989) encontraram índices de fertilidade semelhantes em éguas inseminadas com sêmen congelado armazenado em macrotubos alemães de 4 mL,

na concentração espermática de 100×10^6 espermatozoides/mL e em palhetas de 2 mL, contendo 200×10^6 espermatozoides/mL.

Assim, Nascimento et al. (2008) observou que a qualidade seminal equina pós-descongelamento é influenciada pela concentração espermática, de maneira que há diminuição gradativa nesta qualidade com o aumento gradativo da concentração (de 100 para 200 e de 200 para 400×10^6 espermatozoides/mL) independentemente do volume da palheta utilizado (0,5 ou 0,25 mL).

Corroborando com estes dados, Avanzi (2010) observou efeito significativo ($p < 0,05$) da concentração sobre as variáveis de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), frequência de batimento flagelar e espermatozoides rápidos, denotando superioridade para a criopreservação em concentrações mais baixas. Este autor utilizou as concentrações de 100×10^6 , 200×10^6 e 400×10^6 de espermatozoides totais/mL no meio diluente de congelamento Botu-Crio[®].

Em contrapartida, Blanes et al. (2005), avaliando a motilidade total e progressiva, pelo sistema computadorizado, de amostras de sêmen equino congelado em palhetas de 0,5 mL nas concentrações espermáticas de 100, 200, 300 e 400×10^6 spz/mL, também não encontraram diferença entre as concentrações. Da mesma forma, Heitland et al. (1996) também encontrou igualdade nas motilidade total e progressiva (CASA) entre amostras de sêmen equino congeladas em palhetas de 0,5 mL, nas concentrações de 20, 200 e 400×10^6 spz/mL e somente ocorreu diminuição destas motilidades quando a concentração espermática foi elevada para 800×10^6 spz/mL.

2.1.6 Taxas de congelamento

A taxa de congelamento é de extrema importância na manutenção da integridade celular. Assim, uma taxa ideal deve ser lenta o bastante para permitir a desidratação suficiente da célula espermática para evitar a formação de cristais de gelo intracelular e rápida o bastante para evitar a exposição dos espermatozoides nas soluções hipersaturadas no momento da formação dos cristais de água no ambiente extracelular (GRAHAM, 1996; WATSON, 2000; VARNER, 2007; MEDEIROS, 2007). Para uma ótima taxa de congelamento, requer-se dois passos, a refrigeração até atingir -5°C na taxa de -3 a $-5^\circ\text{C}/\text{min}$ e conseqüentemente a taxa de -20 a $-50^\circ\text{C}/\text{min}$ até atingir -196°C .

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

Outros fatores isolados ou associados como a quantidade de solutos (crioprotetores no meio de congelação), tipo de envase, tempo e altura em relação ao nível do nitrogênio líquido em caixa de isopor e taxa de congelação em máquinas programáveis alteram a velocidade de congelação e a viabilidade espermática após a descongelação (CLULOW, 2008).

Clulow et al. (2008) ao comparar a congelação em caixa isotérmica e máquina programada com taxa rápida, observaram diferenças entre palhetas de 0,5 e 0,25 mL. Estes autores observaram que as palhetas de 0,25 mL em caixa isotérmica apresentaram uma queda mais rápida de temperatura em relação a palheta de 0,5 mL. Em contraste, verificaram uma rápida queda de temperatura em palheta de 0,5 mL no aparelho automatizado de congelação, porém não foram encontradas diferenças nos parâmetros espermáticos entre as amostras criopreservadas. Apesar desta anormalidade de resultados encontrados, estes autores sugerem mais estudos comparando estes dois volumes de armazenamento de sêmen equino.

A comparação entre sistemas automatizados de congelação tem sido objeto de vários estudos nas diversas espécies de animais. Em sêmen suíno, um sistema no qual a taxa de congelação foi de $-40^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ obteve-se uma melhor viabilidade espermática pós-descongelação aos demais sistemas com taxa de congelação em torno de $-60^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$. Os autores atribuem esta melhoria na resposta pós-descongelação ao fato da taxa de congelação rápida expor a célula espermática a um menor tempo na fase de liberação do calor latente durante a formação dos cristais de gelo, período que é extremamente prejudicial à célula espermática (THURSTON et. al., 2003).

Outros autores relatam, entretanto, que o fator individual no sêmen suíno é de grande importância na taxa de congelação. Alguns animais apresentaram melhor qualidade espermática, quando da congelação rápida ($-80^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$) e outros na congelação mais lenta ($-24^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$). Estes mesmos autores descrevem que a variação

individual para a taxa de congelação é definida geneticamente, pela composição da membrana plasmática e das proteínas (MEDRANO, et al., 2009).

Cancel et al. (1997) mostraram que a fertilidade de touros estava associada com a proteína osteopontina, presente no plasma seminal. Eles encontraram uma correlação positiva e significativa entre esta proteína e o não retorno ao cio, em fêmeas inseminadas com sêmen congelado de touros de alta fertilidade. Assim, a otimização das taxas de congelação também depende da expressão de genes, em diferentes níveis celulares, como os componentes do plasma seminal.

Assim, em suínos, as duas maiores famílias de proteínas do plasma seminal identificadas são a espermedesina e a fibronectina tipo II, as quais participam da capacitação e da fertilização. Conseqüentemente, a presença dessas proteínas e a manipulação adequada do ejaculado interferem na congelabilidade do sêmen dessa espécie (BERGERON et. al, 2005).

Em sêmen de garanhões Devireddy et. al., (2002), associaram a permeabilidade da membrana plasmática, com crioprotetores e meios diluentes, com a taxa ideal para congelação do sêmen de garanhões e concluíram que taxa de congelação entre -29°C/minuto com a utilização do diluente Kenney e taxas em torno de -60°C/minuto em diluente a base de Lactose – EDTA permitiram uma desidratação das células espermáticas dentro de seus limites fisiológicos, e foram ideais a congelação de sêmen de garanhões sem que houvesse danos pela formação de cristais intracelulares.

Outro estudo comparando diferentes taxas de congelação com diferentes meios crioprotetores mostraram que em sêmen bovino, taxas rápidas de até -150°C/min, na faixa entre -10°C e -100°C favorecem a porcentagem de espermatozoides viáveis, assim com motilidade elevada, e os valores de VAP, VSL e VCL, nos meios Tris-gema e sucrose (CHAVEIRO et al., 2006).

A relação entre a constituição do meio crioprotetor e a taxa de congelação é de extrema importância na manutenção da integridade da célula espermática. Segundo Woelders et al. (1997) a taxa ideal para congelação de sêmen bovino é obtida na faixa entre -76 e -140°C/minuto, em que são mantidos os parâmetros de integridade de membrana plasmática, acrossomal, motilidade espermática e integridade de DNA. Esta taxa de congelação é elevada comparada a outras espécies como suínos (entre -30 a -50°C/min) e carneiros (entre -50 e -60°C/min). Estes autores relatam que o aumento da osmolaridade do meio e a presença de tetralose ou sucrose conferem maior proteção aos espermatozoides nestas taxas elevadas de congelação.

Os danos celulares provocados em taxas rápidas de congelação são atribuídos a formação de gelo intracelular. Entretanto, Morris et al. (2007) observaram que os mecanismos de lesão a célula espermática devem-se ao balanço osmótico que ocorre durante o processo de descongelação. Neste trabalho, estes autores verificaram que existe uma ampla faixa de resfriamento de espermatozóides equinos. Estes valores variam entre -0,3 a -3000°C/minuto na presença de crioprotetor (glicerol) não apresentaram formação de gelo intracelular, confirmados pela técnica de crioscopia (Cryo Scanning Electron Microscopy - CryoSEM). Pela técnica de calorimetria - Differential Scanning Calorimetry (DSC), estes autores concluíram que os danos provocados a morfologia da célula espermática equina devem-se apenas ao choque osmótico no momento da descongelação.

Em geral uma taxa de congelação tida como ótima, na maioria das espécies animais, varia entre -30 e -50°C/minuto, obedecendo a características de protocolos de congelação, variações entre espécies e indivíduos. Estas taxas de congelação trazem resultados satisfatórios na viabilidade celular (MEDRANO et al., 2009). Já Sieme et al. (2008) afirmam que a taxa ótima de congelação de sêmen equino pode variar entre -20 e -100°C/min, dependendo do método de processamento do ejaculado e do tipo de armazenamento dos espermatozóides.

Diante destes estudos, observa-se que as máquinas de congelação, que controlam a queda de temperatura, possibilitam que sejam minimizadas as variações individuais dentro de cada espécie, reduzindo assim, a proporção de ejaculados ruins (MEDRANO et al., 2009).

3. Material e Métodos

3.1 Experimento 1: Estudo comparativo da viabilidade espermática de garanhões de alta e baixa congelabilidade em diferentes taxas de congelação em palhetas de 0,5 e 0,25 mL.

3.1.1 Animais

Foram utilizados 04 garanhões, das raças Árabe, Hannoverano, Mangalarga Marchador e Westfallen, sob regime regular de colheita de sêmen, pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina – “CERBEQ”, vinculado ao

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, SP.

3.1.2 Colheita dos ejaculados

Antes da colheita dos ejaculados foi realizada a higienização do pênis de cada garanhão, com água corrente e secagem com compressa estéril para a remoção das sujidades.

As colheitas de sêmen foram realizadas em manequim com vagina artificial modelo “Botucatu” (Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil) constituída de resina de fibra de vidro, mucosa de látex, mucosa plástica e copo coletor revestido de camisa sanitária descartável, totalizando 03 ejaculados de cada garanhão para cada protocolo de congelação.

3.1.3 Processamento e criopreservação das amostras

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

Para criopreservação dos ejaculados empregou-se a técnica descrita por Papa et al. (2002), na qual cada ejaculado foi diluído em meio diluente à base de leite desnatado e glicose (Botu-Sêmen[®], Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil) em uma proporção de 1:1 (meio:sêmen) e centrifugado a 600g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os *pellets* ressuspensos para a concentração de 100×10^6 de espermatozóides totais no meio diluente de congelação Botu-Crio[®] (Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil).

Após a adição do diluente de congelação e adequada homogeneização, as amostras de sêmen foram envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL e de 0,25 mL, previamente identificadas com o nome do garanhão, partida da colheita do ejaculado e protocolo de congelação, e em seguida lacradas com álcool polivinílico.

O total de palhetas foi dividido em 3 partes, uma parte destinada a congelação em caixa de isopor, outra parte destinada a congelação na máquina automatizada Mini Digitcool[®] ZH 400 (IMV Technologies, França) e as palhetas restantes submetidas a congelação na máquina automatizada TK[®] 4000C (TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Minas Gerais, Brasil).

Assim, as palhetas foram distribuídas em uma grade e resfriadas a 5°C por 20 minutos em geladeira Minitub[®] (Minitub do Brasil Ltda), na taxa de -3 a -5°C/minuto. Decorrido este período, a grade contendo as palhetas foram transferidas para os devidos sistemas de congelação.

A taxa de congelação na caixa de isopor foi realizada utilizando uma caixa isotérmica de isopor de 42 litros com 3,5cm de nitrogênio (N₂) líquido e as palhetas dispostas horizontalmente a 6 cm acima do nível do N₂, com uma taxa de congelação com velocidade de 10°C/min entre 5°C e -60°C e velocidade de 8°C/min entre -60°C e -100°C.

Os equipamentos automatizados Mini Digitcool[®] ZH 400 (IMV - Technologies - França) e TK[®] 4000C (TK Tecnologia em Congelação) possibilitam apenas uma taxa por processamento, sendo assim os protocolos de congelação foram realizados conforme descrito a seguir:

- Protocolo 1:

- Congelação em caixa de isopor: velocidade de 10°C/min entre 5°C a -60°C e velocidade de 8°C/min entre -60°C a -110°C.
- Máquina Automática TK[®] 4000C: velocidade de 15°C/min entre 5°C a -10°C e velocidade de 20°C/min entre -10°C a -140°C.
- Máquina Automática Mini Digitcool[®] ZH 400: velocidade de 15°C/min entre 5°C a -10°C e velocidade de 20°C/min entre -10°C a -140°C.

- Protocolo 2:

- Congelação em caixa de isopor: velocidade de 10°C/min entre 5°C a -60°C e velocidade de 8°C/min entre -60°C a -110°C.

- Máquina Automática TK[®] 4000C: velocidade de 15°C/min entre 5°C a -10°C e velocidade de 40°C/min entre -10°C a -140°C.
- Máquina Automática Mini Digitcool[®] ZH 400: velocidade de 15°C/min entre 5°C a -10°C e velocidade de 40°C/min entre -10°C a -140°C.

- Protocolo 3:

- Congelação em caixa de isopor: velocidade de 10°C/min entre 5°C a -60°C e velocidade de 8°C/min entre -60°C a -110°C.
- Máquina Automática TK[®] 4000C: velocidade de 15°C/min entre 5°C a -10°C e velocidade de 40°C/min entre -10°C a -140°C.
- Máquina Automática Mini Digitcool[®] ZH 400: velocidade de 15°C/min entre 5°C a -10°C e velocidade de 60°C/min entre -10°C a -140°C.

Após realizada a taxa de congelação, as palhetas francesas foram mergulhadas em nitrogênio líquido a -196°C, colocadas em *globettes* devidamente identificados de acordo com o protocolo de congelação e então armazenados em botijões criogênicos.

Na figura 1 está simplificado o esquema de congelação de sêmen equino criopreservado.

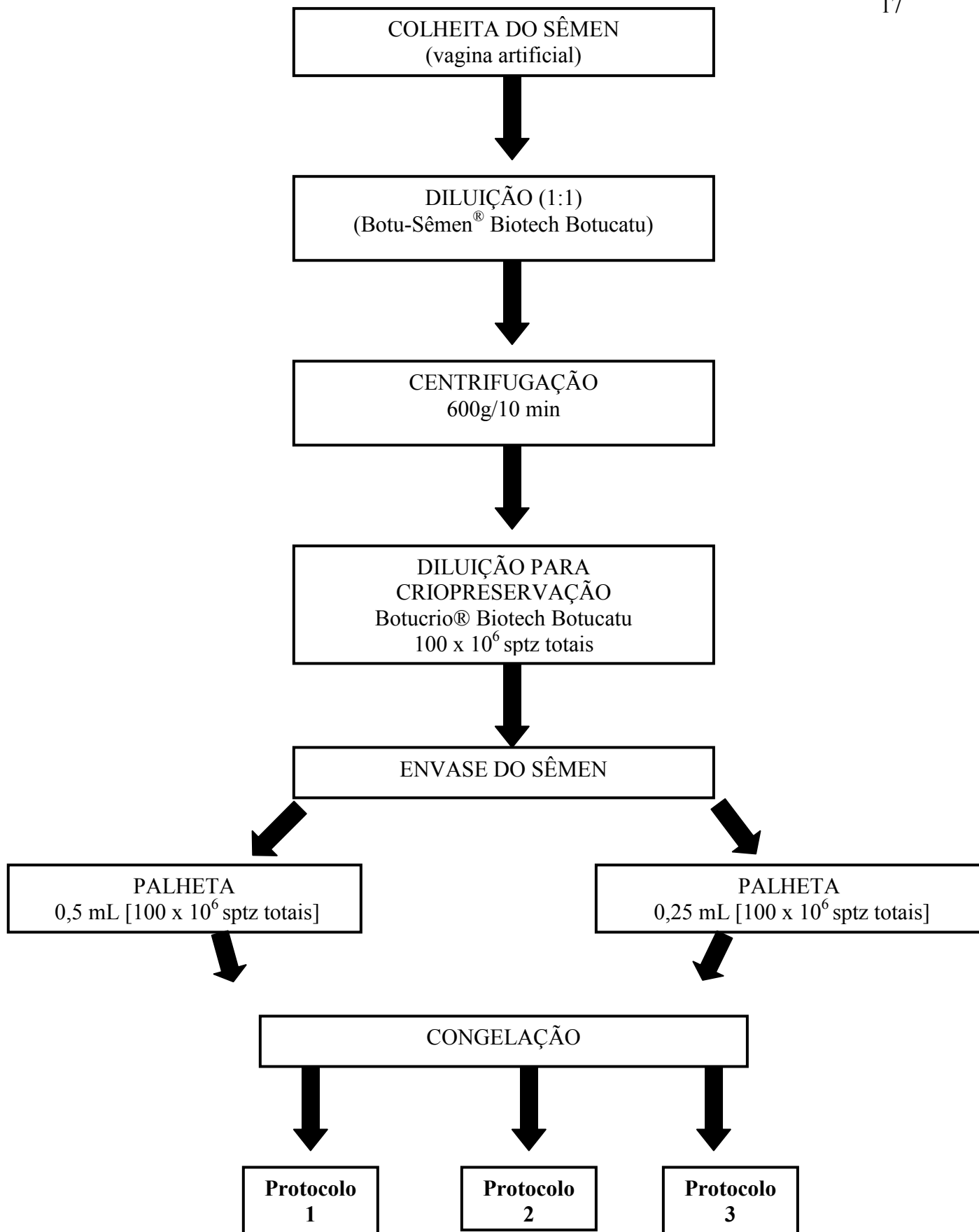


Figura 1: Esquema simplificado do processamento do sêmen equino criopreservado.

3.1.4 Descongelamento das amostras e avaliações espermáticas

Para as palhetas de 0,5 mL a descongelamento foi realizada a 46°C por 20 segundos. Já para as palhetas de 0,25 mL a descongelamento foi realizada a 46°C por 15 segundos. Para análise das amostras de sêmen criopreservado empregou-se a avaliação computadorizada considerando as seguintes variáveis: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral de cabeça (AHL, μm), percentagem de espermatozóide rápidos (RAP, %) e percentagem de espermatozoides médios (MED, %).

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

3.1.5 Análise estatística

A análise estatística das variáveis estudadas no sêmen congelado/descongelado foi realizada mediante o pacote SAS 9.1. Inicialmente, empregou-se o programa R de análise descritiva Box Plot. Em seguida, os dados foram analisados mediante o programa Proc. MIXED, uma análise de variância, para investigar o efeito do tratamento, ou seja, as taxas de congelamento e as palhetas utilizadas, considerando o efeito animal como aleatório. Foram consideradas variâncias heterogêneas nos vários tratamentos. Adotou-se um nível de probabilidade de 0,05 para diferenças estatisticamente significativas.

3.2 Experimento 2: Comparação dos parâmetros espermáticos e a fertilidade de espermatozoides congelados com diferentes taxas de congelamento.

3.2.1 Animais

Foram utilizados 04 garanhões, clinicamente sadios, previamente submetidos a exame andrológico com idade entre 6 a 15 anos, das raças Árabe, Hannoverano, Mangalarga Marchador e Westfallen, sob regime regular de colheita de sêmen,

pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina – “CERBEQ”, vinculado ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, São Paulo.

Para o teste de fertilidade foram utilizadas 35 éguas da raça Brasileiro de Hípismo, clinicamente sadias, sendo 20 primíparas e 15 múltiparas, pertencentes ao Haras Itapuã da cidade de Avaré/SP.

3.2.2 Colheita dos ejaculados

Para o teste de fertilidade foram colhidos dois ejaculados por garanhão, com os mesmos procedimentos descritos no item 3.1.2.

3.2.3 Processamento e criopreservação das amostras

Após a colheita, o sêmen foi processado conforme descrito no experimento 1 (item 3.1.3). Porém, após a adição do diluente de congelação Botu-Crio® (Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil) e homogeneização das amostras, o sêmen foi envasado apenas em palhetas francesas de 0,5 mL, com concentração espermática de 100×10^6 espermatozóides viáveis/mL e em seguida lacradas com álcool polivinílico.

Assim, o total de palhetas foi dividido em 3 partes, distribuídas em grades e resfriadas a 5°C por 20 minutos em geladeira Minitub® (Minitub do Brasil Ltda). Decorrido este período, as grades contendo as palhetas foram transferidas para os devidos meios de congelação, obedecendo ao protocolo de congelação 2, conforme descrito anteriormente (item 3.1.3).

3.2.4 Teste de fertilidade

As éguas foram distribuídas aleatoriamente em 03 grupos: caixa de isopor, máquina 1 (TK® 4000) e máquina 2 (Mini Digitcool® ZH 400). E distribuídas conforme o acasalamento, sendo o garanhão “A” do Haras Itapuã, ou garanhão “B” do Haras Itapuã ou com o “pool” dos ejaculados dos garanhões pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina “CERBEQ” do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ - UNESP, conforme a escolha do Médico Veterinário responsável pelo Haras.

As fêmeas foram monitoradas por exame ultrassonográfico transretal e depois da constatação de um folículo com 35 mm a ovulação foi induzida com 1 mg de GnRH (deslorelina). Passadas 36 horas da administração do indutor de ovulação, os animais foram acompanhados de 6 em 6 horas, por ultrassonografia do aparelho genital, até a detecção da ovulação e neste momento inseminadas com 8 palhetas com 100×10^6 de espermatozóides móveis pré-congelamento.

As palhetas foram descongeladas a 46°C por 20 segundos e posteriormente os espermatozóides depositados na extremidade do corno uterino com auxílio de pipeta flexível¹, pelo desvio por manipulação retal. As palhetas foram acondicionadas dentro da pipeta flexível e com auxílio de um mandril os espermatozóides foram depositados na extremidade do corno ipsilateral a ovulação.

O diagnóstico de gestação foi realizado entre 12 e 15 dias após a ovulação, com auxílio do ultrassom (Pie Medical Falcon 100 Vet).

3.2.5 Análise estatística

A análise estatística para comparar os diferentes ganhões foi realizada mediante ao teste não paramétrico de Kruskal Wallis em virtude do baixo número de ejaculados colhidos ($n= 2$). Para avaliação dos índices de fertilidade entre os ganhões e metodologias de congelamento realizou-se análise de regressão logística múltipla incluindo nos modelos as variáveis ganhão e metodologia. Adotou-se um nível de probabilidade de 0,05 para diferenças estatisticamente significativas.

4. Resultados

4.1 Resultados Experimento 1

Comparação entre diferentes taxas de congelamento na criopreservação do sêmen equino em palhetas de 0,5 e 0,25 mL

¹ Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre-RS, Brasil

Nas tabelas 1 e 2 estão demonstrados os valores médios e os erros padrão das médias pós-descongelamento analisadas pelo sistema computadorizado *CASA* e pela microscopia de epi-fluorescência dos espermatozoides equinos criopreservados.

Na tabela 3 estão demonstradas as médias totais e os erros padrão das médias nas palhetas de 0,5 e de 0,25 mL.

Tabela 1. Médias com respectivos erros padrão das variáveis analisadas pós-descongelamento de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), percentagem de espermatozoides rápidos (RAP, %) e integridade de membrana plasmática (IMP, %) nos diferentes protocolos de congelamento.

Protocolo de congelamento	Parâmetros espermáticos			
	MT (%)	MP (%)	RAP (%)	IMP (%)
C ¹ 0,5	67,3 (4,5) ^a	27,8 (3,3) ^a	50,4 (6,8) ^a	38,9 (2,6) ^a
C ¹ 0,25	60,5 (4,6) ^b	24,3 (3,4) ^b	43,9 (6,9) ^b	33,4 (2,4) ^a
M1 20 ² 0,5	67,5 (5,2) ^a	29,8 (3,6) ^a	52,8 (7,3) ^a	37,3 (2,1) ^a
M1 20 ² 0,25	63,1 (4,7) ^b	24,9 (3,8) ^b	46,6 (7,6) ^b	34,7 (2,7) ^a
M1 40 ³ 0,5	69,9 (4,6) ^a	29,6 (3,4) ^a	54,6 (6,9) ^a	38,2 (2,2) ^a
M1 40 ³ 0,25	61,9 (4,8) ^b	25,2 (3,4) ^b	47,7 (7,1) ^b	37,1 (2,0) ^a
M2 20 ⁴ 0,5	67,7 (5,0) ^a	28,5 (3,3) ^a	53,2 (7,3) ^a	48,7 (3,1) ^a
M2 20 ⁴ 0,25	61,0 (5,3) ^b	23,9 (3,7) ^b	42,8 (8,3) ^b	44,7 (2,9) ^a
M2 40 ⁵ 0,5	71,1 (4,6) ^a	30,9 (3,6) ^a	55,4 (7,1) ^a	37,8 (2,8) ^a
M2 40 ⁵ 0,25	62,0 (5,1) ^b	24,5 (3,7) ^b	45,4 (7,5) ^b	33,4 (2,4) ^a
M2 60 ⁶ 0,5	66,2 (4,9) ^a	29,2 (3,6) ^a	51,7 (7,4) ^a	34,2 (2,6) ^a
M2 60 ⁶ 0,25	60,5 (4,8) ^b	26,5 (3,5) ^b	46,3 (7,3) ^b	32,6 (3,4) ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Onde: 0,5: palheta francesa de 0,5 mL; 0,25: palheta francesa de 0,25 mL.

Onde: C¹: congelamento em caixa de isopor, M1 20²: congelamento em máquina TK® 4000C; taxa de -20°C/min; M1 40³: congelamento em máquina TK® 4000C; taxa de -40°C/min; M2 20⁴: congelamento em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -20°C/min; M2 40⁵: congelamento em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -40°C/min; M2 60⁶: congelamento em máquina Mini Digitcool®de -60°C/min.

Tabela 2. Médias com respectivos erros padrão das variáveis analisadas pós-descongelação de velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$) nos diferentes protocolos de congelamento.

Protocolo de congelamento	Parâmetros espermáticos		
	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)
C ¹ 0,5	91,9 (4,3) ^a	71,3 (3,1) ^a	172,8 (6,1) ^a
C ¹ 0,25	90,1 (4,3) ^b	69,7 (3,1) ^b	168,0 (6,1) ^b
M1 20 ² 0,5	94,7 (4,4) ^a	73,7 (3,1) ^a	176,9 (6,5) ^a
M1 20 ² 0,25	93,5 (4,9) ^b	71,6 (3,5) ^b	174,5 (7,2) ^b
M1 40 ³ 0,5	95,5 (4,3) ^a	73,2 (3,0) ^a	177,7 (6,2) ^a
M1 40 ³ 0,25	93,9 (4,4) ^b	72,1 (3,2) ^b	173,7 (6,4) ^b
M2 20 ⁴ 0,5	96,1 (4,7) ^a	73,9 (3,2) ^a	179,9 (6,9) ^a
M2 20 ⁴ 0,25	90,9 (5,3) ^b	69,4 (3,7) ^b	170,7 (7,6) ^b
M2 40 ⁵ 0,5	96,5 (4,7) ^a	75,1 (3,3) ^a	178,0 (6,3) ^a
M2 40 ⁵ 0,25	90,3 (4,8) ^b	69,5 (3,4) ^b	169,5 (6,9) ^b
M2 60 ⁶ 0,5	92,6 (4,5) ^a	71,8 (3,3) ^a	171,2 (6,5) ^a
M2 60 ⁶ 0,25	94,3 (4,6) ^b	73,1 (3,3) ^b	173,9 (6,7) ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Onde: 0,5: palheta francesa de 0,5 mL; 0,25: palheta francesa de 0,25 mL.

Onde: C¹: congelamento em caixa de isopor, M1 20²: congelamento em máquina TK® 4000C; taxa de -20°C/min; M1 40³: congelamento em máquina TK® 4000C; taxa de -40°C/min; M2 20⁴: congelamento em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -20°C/min; M2 40⁵: congelamento em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -40°C/min; M2 60⁶: congelamento em máquina Mini Digitcool®de -60°C/min

Tabela 3. Médias e erro padrão das características do movimento espermático avaliados pelo sistema CASA e pela microscopia de epi-fluorescência de sêmen equino congelado em palhetas francesas de 0,5 e 0,25 mL.

Parâmetros espermáticos	Volume da palheta (mL)	
	0,5	0,25
MT (%)	68,3 (4,3) ^a	61,5 (4,3) ^b
MP (%)	29,3 (3,2) ^a	24,9 (3,3) ^b
RAP (%)	53,0 (6,8) ^a	45,4 (6,8) ^b
VAP (µm/s)	94,5 (4,2) ^a	92,2 (4,2) ^b
VSL (µm/s)	73,2 (2,9) ^a	70,9 (3,0) ^b
VCL (µm/s)	176,1 (5,9) ^a	171,7 (5,9) ^b
IMP (%)	39,2 (2,6)	35,9 (2,6)

Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; RAP: espermatozóides rápidos; VAP: velocidade ao longo de uma trajetória média; VSL: velocidade; VCL: velocidade curvilinear; IMP: integridade de membrana plasmática.

4.1.1 Efeito do volume de armazenamento

Quando comparados os dois tipos de palhetas francesas (0,5mL e 0,25 mL) nos protocolos de congelação foram encontradas diferenças estatísticas nos seguintes parâmetros espermáticos: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, %), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s) e percentagem de espermatozóides rápidos (RAP, %).

Conforme observado na tabela 1, as motilidade espermáticas computadorizadas diferiram entre os dois volumes estudados ($p < 0,05$), sendo a percentagem geral média da motilidade total (MT) de 68,3 para a congelação utilizando palheta de 0,5 mL e 61,5 para palheta de 0,25 mL e da motilidade progressiva (MP) de 29,3 na palheta de 0,5 mL e 24,9 na palheta de 0,25 mL.

Além da motilidade, a percentagem de espermatozóides rápidos também diferiu entre os volumes ($p < 0,05$), sendo a percentagem geral média em palhetas de 0,5 mL de 53,0 e em palhetas de 0,25 mL de 45,4.

A percentagem média de espermatozóides com membrana plasmática integra não diferiu entre os volumes das palhetas sendo para as palhetas de 0,5 mL de 39,2 e em palhetas de 0,25 mL de 35,9.

Para todas as variáveis de velocidade espermática avaliadas neste experimento (Tabela 2) observou-se diferença estatística entre os volumes da palheta. Para a velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP) ($p < 0,05$), as médias foram de 94,2 para a palheta de 0,5 mL e de 92,2 $\mu\text{m/s}$ para a palheta de 0,25 mL. Para a velocidade progressiva (VSL) ($p < 0,05$), as médias foram de 73,2 para a palheta de 0,5 mL e de 70,9 $\mu\text{m/s}$ para a palheta de 0,25 mL e para a velocidade curvilínea (VCL) as médias foram para a palheta de 0,5 mL de 176,1 e de 171,7 $\mu\text{m/s}$ para a palheta de 0,25 mL.

4.1.2 Efeito do protocolo de congelação

Não foram observadas diferenças estatísticas nas avaliações espermáticas pós-descongelação, entre os protocolos de congelação ($p > 0,05$) utilizados, como demonstrados nas tabelas 1 e 2. Os resultados dos três protocolos de congelação utilizados serão apresentados individualmente a seguir:

- Protocolo 1: taxa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$:

A motilidade total (MT) na taxa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ não diferiu entre os protocolos de congelação ($p > 0,05$) tendo na caixa de isopor (C) a percentagem média de 67,3 em palheta de 0,5 mL e de 60,5 em palheta de 0,25 mL. Na máquina TK® 4000 (M1 20) percentagem média de 67,5 em palheta de 0,5 mL e de 63,1 em palheta de 0,25 mL. E na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 20) a percentagem média de 67,7 em palheta de 0,5 mL e 61,0 em palhetas de 0,25 mL.

Para a motilidade progressiva (MP) na taxa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a estatística não indicou diferença entre os métodos de congelação ($p > 0,05$) utilizados, sendo na caixa de isopor (C) a percentagem média de 27,8 para palheta de 0,5 mL e de 24,3, na máquina TK® 4000 (M1 20) a percentagem média de 29,8 para a palheta de 0,5 mL e de 24,9 para a palheta de 0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 20) a

percentagem média foi de 28,5 para a palheta de 0,5 mL e de 23,9 para a palheta de 0,25 mL.

A percentagem média de espermatozóides rápidos (RAP) na taxa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na caixa de isopor (C) foi de 50,4 para palhetas de 0,5 mL e 43,9 nas palhetas de 0,25 mL. Na máquina TK® 4000 (M1 20) percentagem média foi de 52,8 para palhetas de 0,5 mL e de 46,6 para palhetas de 0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 20) a percentagem média de 53,2 para palhetas de 0,5 mL e de 42,8 para palhetas de 0,25 mL. Estes dados também não diferiram entre os protocolos de congelação ($p > 0,05$) realizados.

As velocidades espermáticas também não apresentaram diferenças estatísticas entre os protocolos de congelação na taxa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, denotando a velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP) uma média na caixa de isopor (C) de 91,9 em palhetas de 0,5 mL e de 90,1 $\mu\text{m}/\text{s}$ em palhetas de 0,25 mL, na máquina TK® 4000 (M1 20) de 94,7 para palhetas de 0,5 mL e 93,5 $\mu\text{m}/\text{s}$ em palhetas de 0,25 mL. E na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 20) a média de 96,1 nas palhetas de 0,5 mL e de 90,9 $\mu\text{m}/\text{s}$ em palhetas de 0,25 mL.

Para a velocidade progressiva (VSL) os valores obtidos na taxa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, apresentaram igualdade entre os métodos de congelação apresentando na caixa de isopor (C) média de 71,3 em palhetas de 0,5 mL e 69,7 $\mu\text{m}/\text{s}$ em palhetas de 0,25 mL, na máquina TK® 4000 (M1 20) de 73,7 em palhetas de 0,5 mL e 71,6 $\mu\text{m}/\text{s}$ em palhetas de 0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 20) 73,9 para palhetas de 0,5 mL e 69,4 $\mu\text{m}/\text{s}$ em palhetas de 0,25 mL.

A velocidade curvilínea (VCL) apresentou dados similares quando da utilização da taxa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$, sendo na caixa de isopor (C) a média de 172,8 para palhetas de 0,5 mL e de 168,0 $\mu\text{m}/\text{s}$ em palhetas de 0,25 mL, na máquina TK® 4000 (M1 20) de 176,9 nas palhetas de 0,5 mL e de 174,5 $\mu\text{m}/\text{s}$ em palhetas de 0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 20) de 179,9 em palhetas de 0,5 mL e de 170,7 $\mu\text{m}/\text{s}$ em palhetas de 0,25 mL.

Para o parâmetro de percentagem de espermatozóide com membrana plasmática íntegra (IMP) na taxa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ não foram demonstradas diferenças estatística entre os métodos de congelação tendo como média na caixa de isopor (C) um valor de 38,9 em palhetas de 0,5 mL e de 33,4 em palhetas de 0,25 mL, na máquina TK® 4000 (M1 20) de 37,3 em palhetas de 0,5 mL e 38,7 nas palhetas de 0,25 mL e na máquina Mini

Digitcool® ZH 400 (M2 20) de 34,7 nas palhetas de 0,5 mL e de 44,7 em palhetas de 0,25 mL.

- Protocolo 2: taxa de -40°C/minuto:

Como todos os protocolos de congelação têm a caixa de isopor (C) como um grupo controle, os dados obtidos por esse método de congelação não serão repetidos.

A motilidade total (MT) na taxa de -40°C/min não diferiu entre os protocolos de congelação ($p > 0,05$) tendo na máquina TK® 4000 (M1 40) a percentagem média de 69,9 em palhetas de 0,5 mL e 61,9 em palhetas de 0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 40) de 71,1 nas palhetas de 0,5 mL e 62,0 em palhetas de 0,25mL.

Para o parâmetro de motilidade progressiva (MP) na taxa de -40°C/min observou-se resultados sem diferenças estatísticas entre os protocolos ($p > 0,05$), apresentando como média na máquina TK® 4000 (M1 40) a percentagem média de 29,6 em palhetas de 0,5 mL e de 25,2 nas palhetas de 0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 40) de 30,9 nas palhetas de 0,5 mL e de 24,5 em palhetas de 0,25mL.

A percentagem média de espermatozóides rápidos (RAP) na taxa de -40°C/min na máquina TK® 4000 (M1 40) percentagem média foi de 54,6 (6,9) para palhetas de 0,5 mL e de 47,7 para palhetas de 0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 40) a percentagem média de 55,4 para palhetas de 0,5 mL e de 45,4 para palhetas de 0,25 mL. Estes dados também não diferiram entre os protocolos de congelação ($p > 0,05$) realizados.

As velocidades espermáticas também não apresentaram diferenças estatísticas entre os protocolos de congelação na taxa de -40°C/min, denotando a velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP) a média na máquina TK® 4000 (M1 40) de 95,5 para palhetas de 0,5 mL e 93,9 $\mu\text{m/s}$ em palhetas de 0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 40) a média de 96,5 nas palhetas de 0,5 mL e de 90,3 $\mu\text{m/s}$ em palhetas de 0,25 mL.

Para a velocidade progressiva (VSL) os valores obtidos na taxa de -40°C/min, apresentaram igualdade entre os métodos de congelação apresentando como média na máquina TK® 4000 (M1 40) de 73,2 em palhetas de 0,5 mL e 72,1 $\mu\text{m/s}$ em palhetas de

0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 40) de 75,1 para palhetas de 0,5 mL e 69,5 $\mu\text{m/s}$ em palhetas de 0,25 mL.

Igualdade entre os protocolos também foram observadas na velocidade curvilínea (VCL) quando da utilização da taxa de $-40^\circ\text{C}/\text{min}$, sendo na máquina TK® 4000 (M1 40) de 177,7 nas palhetas de 0,5 mL e de 173,7 $\mu\text{m/s}$ em palhetas de 0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 40) de 178,0 em palhetas de 0,5 mL e de 169,5 $\mu\text{m/s}$ em palhetas de 0,25 mL.

Para os valores de percentagem de espermatozóide com membrana plasmática íntegra (IMP) na taxa de $-40^\circ\text{C}/\text{min}$ não se observaram diferenças estatísticas entre os métodos de congelação tendo como média na máquina TK® 4000 (M1 40) de 38,2 em palhetas de 0,5 mL e 37,1 nas palhetas de 0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 40) de 37,8 nas palhetas de 0,5 mL e de 33,4 em palhetas de 0,25 mL.

- Protocolo 3: taxa de $-60^\circ\text{C}/\text{minuto}$:

Como apenas a máquina Mini Digitcool® ZH 400 possibilita a realização da taxa de $-60^\circ\text{C}/\text{min}$, foram realizadas durante este protocolo a taxa de congelação na caixa de isopor (C), como grupo controle e a taxa de $-40^\circ\text{C}/\text{min}$ na máquina TK® 4000 por ser a taxa mais rápida desse equipamento.

Como descrito nas tabelas 1 e 2, a média de motilidade total (MT) obtidas no protocolo 3 não apresentaram diferenças estatísticas entre as metodologias de congelação, sendo a máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 60) de 66,2 % nas palhetas de 0,5 mL e de 60,5 % nas palhetas de 0,25 mL.

Para os valores de motilidade progressiva (MP) não foram encontradas diferenças entre os métodos de congelação apresentando como média na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 60) de 29,2 em palhetas de 0,5 mL e de 26,5 em palhetas de 0,25 mL.

A percentagem média de espermatozoides rápidos (RAP) na taxa de $-60^\circ\text{C}/\text{min}$ a máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 60) foi de 51,7 para palhetas de 0,5 mL e de 46,3 para palhetas de 0,25 mL. Estes dados também não diferiram entre os protocolos de congelação ($p > 0,05$) realizados.

As velocidades espermáticas também não apresentaram diferenças estatísticas entre os protocolos de congelação na taxa de $-60^\circ\text{C}/\text{min}$, denotando a velocidade ao

longo de uma trajetória média (VAP) a média na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 60) de 92,6 nas palhetas de 0,5 mL e de 94,3 $\mu\text{m/s}$ em palhetas de 0,25 mL.

Para a velocidade progressiva (VSL) os valores obtidos na taxa de -60°C/min , apresentaram igualdade entre os métodos de congelação apresentando como média a máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 60) de 71,8 para palhetas de 0,5 mL e 73,1 $\mu\text{m/s}$ em palhetas de 0,25 mL.

Igualdade entre os protocolos também foram observadas na velocidade curvilínea (VCL) quando da utilização da taxa de -60°C/min , sendo na máquina TK® 4000 (M1 40) de 177,7 nas palhetas de 0,5 mL e de 173,7 $\mu\text{m/s}$ em palhetas de 0,25 mL e na máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 40) de 178,0 em palhetas de 0,5 mL e de 169,5 $\mu\text{m/s}$ em palhetas de 0,25 mL.

Para os valores de percentagem de espermatozóide com membrana plasmática íntegra (IMP) na taxa de -60°C/min não se observaram diferenças estatística entre os métodos de congelação tendo como média a máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2 60) de 34,2 nas palhetas de 0,5 mL e de 32,6 em palhetas de 0,25 mL.

Os gráficos de 1 a 9 representam uma análise descritiva - Box Plot, dos parâmetros espermáticos obtidos pelo método computadorizado CASA como motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral de cabeça (AHL, μm), percentagem de espermatozóide rápidos (RAP, %), percentagem de espermatozóides médios (MED, %) e pela integridade de membrana plasmática (IMP, %) por microscopia de epi-fluorescência.

Estes gráficos são representados esquematicamente como: o traço espesso na horizontal – mediana; retângulo separado em 1º quartil (acima) e 2º quartil (abaixo); traço descontínuo – valores permitidos.

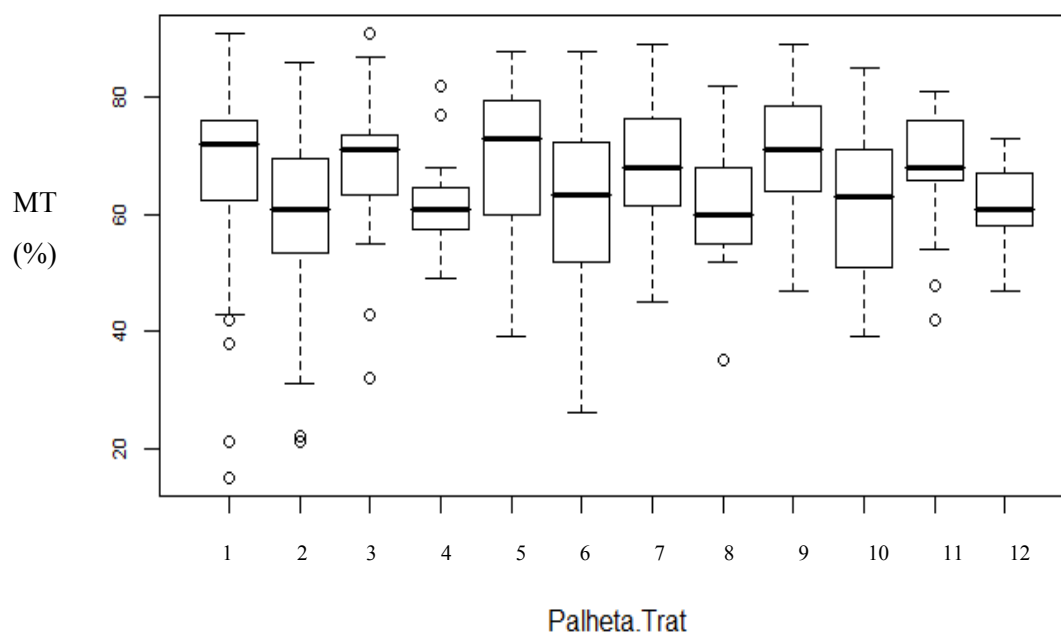


Gráfico 1: Parâmetros espermáticos de Motilidade Total (MT, %) nos diversos protocolos de congelamento e nos dois volumes de palhetas.

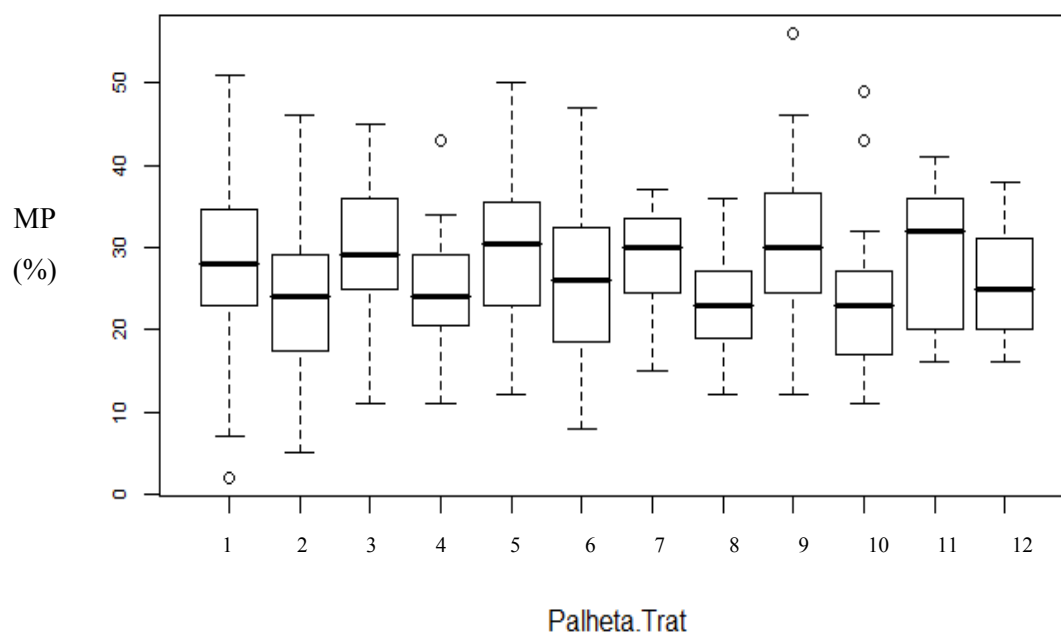


Gráfico 2: Parâmetros espermáticos de Motilidade Progressiva (MP, %) nos diversos protocolos de congelamento e nos dois volumes de palhetas.

Onde: eixo X: **Palheta.Trat:** **1c**¹: congelamento em caixa de isopor e palheta de 0,5 mL; **2c**²: congelamento em caixa de isopor e palheta de 0,25 mL; **1m120**³: congelamento em máquina TK® 4000C; taxa de -20°C/min; e palheta de 0,5 mL; **2m120**⁴: congelamento em máquina TK® 4000C; taxa de -20°C/min; e palheta de 0,25 mL; **1m140**⁵: congelamento em máquina TK® 4000C; taxa de -40°C/min; e palheta de 0,5 mL; **2m140**⁶: congelamento em máquina taxa TK® 4000C de -40°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m220**⁷: congelamento em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -20°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m220**⁸: congelamento em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -20°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m240**⁹: congelamento em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -40°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m240**¹⁰: congelamento em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -40°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m260**¹¹: congelamento em máquina Mini Digitcool®de -60°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m260**¹²: congelamento em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -60°C/min e palheta de 0,25 mL.

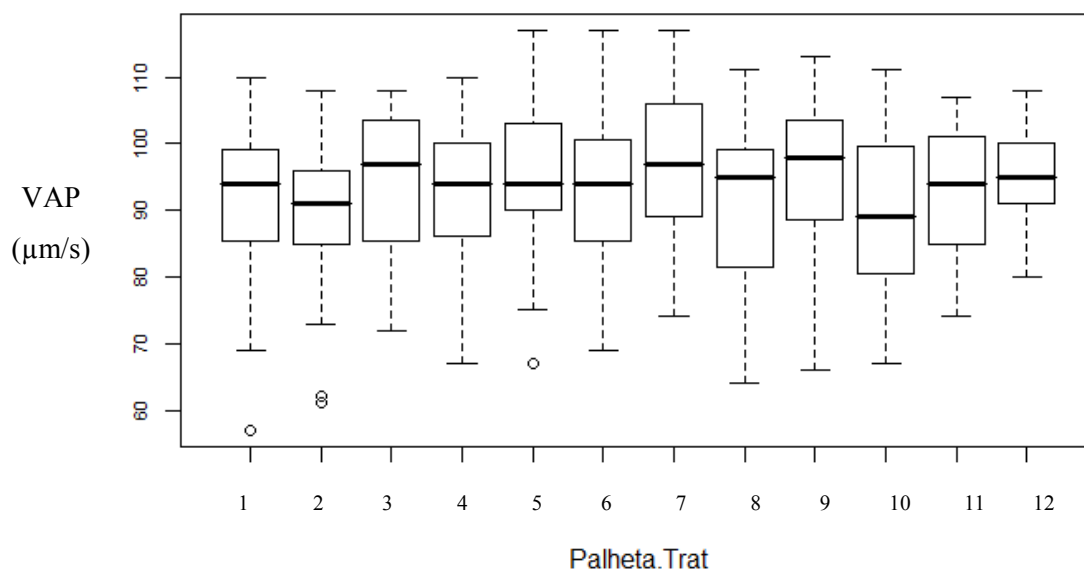


Gráfico 3: Parâmetros espermáticos de Velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, µm/s) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas.

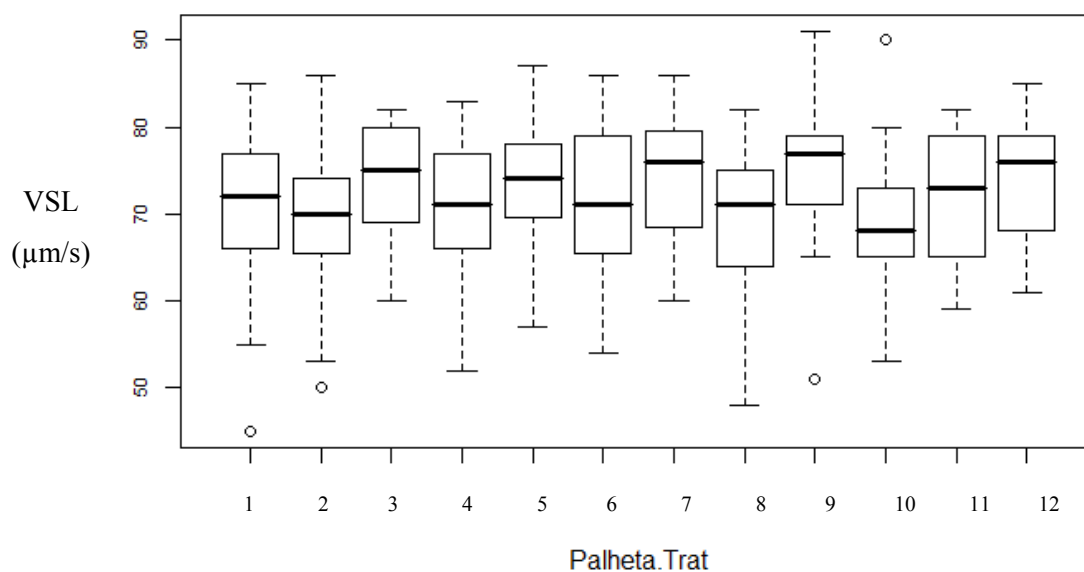


Gráfico 4: Parâmetros espermáticos de Velocidade Progressiva (VSL, µm/s) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas.

Eixo X: Palheta.Trat: **1c¹**: congelação em caixa de isopor e palheta de 0,5 mL; **2c²**: congelação em caixa de isopor e palheta de 0,25 mL; **1m120³**: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de -20°C/min; e palheta de 0,5 mL; **2m120⁴**: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de -20°C/min; e palheta de 0,25 mL; **1m140⁵**: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de -40°C/min; e palheta de 0,5 mL; **2m140⁶**: congelação em máquina taxa TK® 4000C de -40°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m220⁷**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -20°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m220⁸**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -20°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m240⁹**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -40°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m240¹⁰**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -40°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m260¹¹**: congelação em máquina Mini Digitcool®de -60°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m260¹²**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -60°C/min e palheta de 0,25 mL.

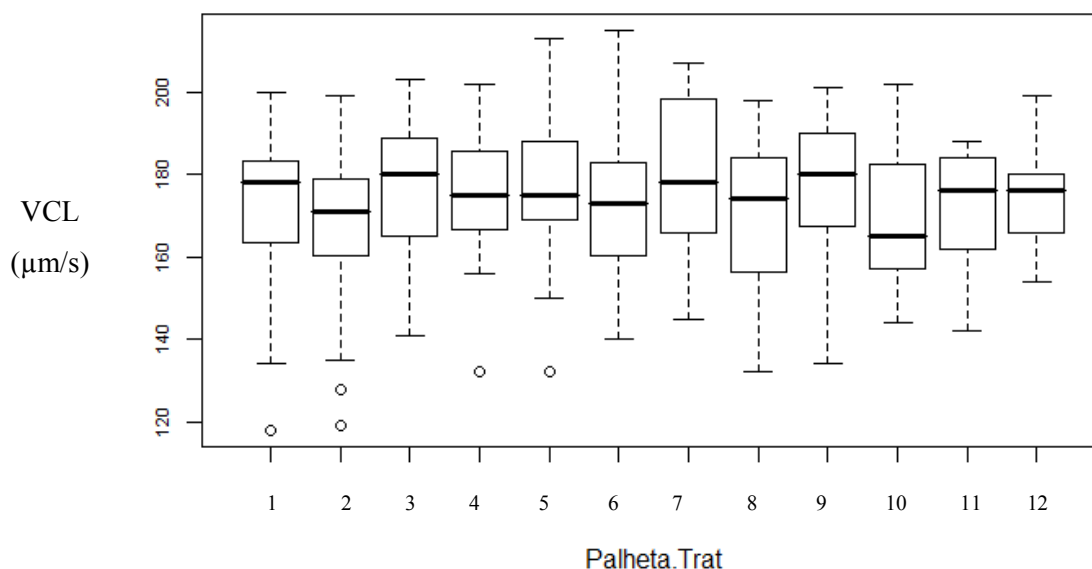


Gráfico 5: Parâmetros espermáticos de Velocidade Curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas.

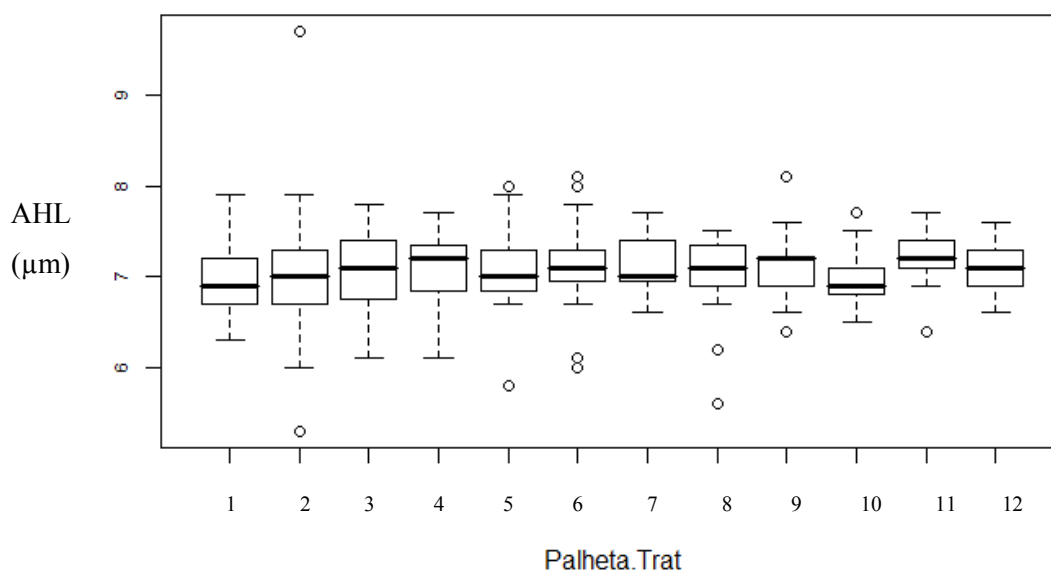


Gráfico 6: Parâmetros espermáticos de Deslocamento Lateral de Cabeça (μm) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas.

Eixo X: Palheta.Trat: **1c¹**: congelação em caixa de isopor e palheta de 0,5 mL; **2c²**: congelação em caixa de isopor e palheta de 0,25 mL; **1m120³**: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$; e palheta de 0,5 mL; **2m120⁴**: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$; e palheta de 0,25 mL; **1m140⁵**: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$; e palheta de 0,5 mL; **2m140⁶**: congelação em máquina taxa TK® 4000C de $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e palheta de 0,25 mL; **1m220⁷**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e palheta de 0,5 mL; **2m220⁸**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e palheta de 0,25 mL; **1m240⁹**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e palheta de 0,5 mL; **2m240¹⁰**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e palheta de 0,25 mL; **1m260¹¹**: congelação em máquina Mini Digitcool®de $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e palheta de 0,5 mL; **2m260¹²**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e palheta de 0,25 mL.

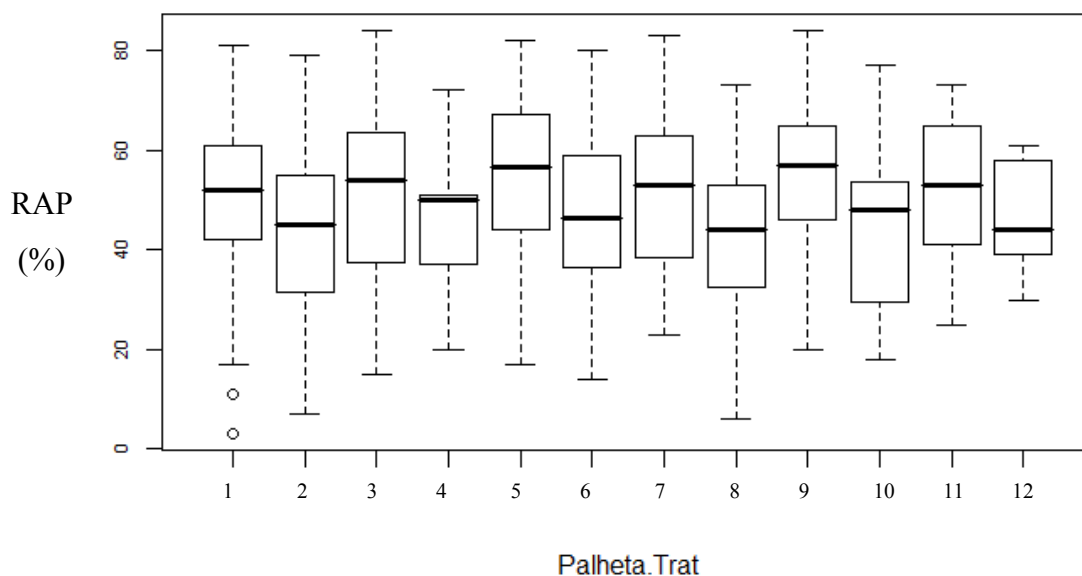


Gráfico 7: Parâmetros espermáticos de percentagem de espermatozóides rápidos (RAP, %) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas.

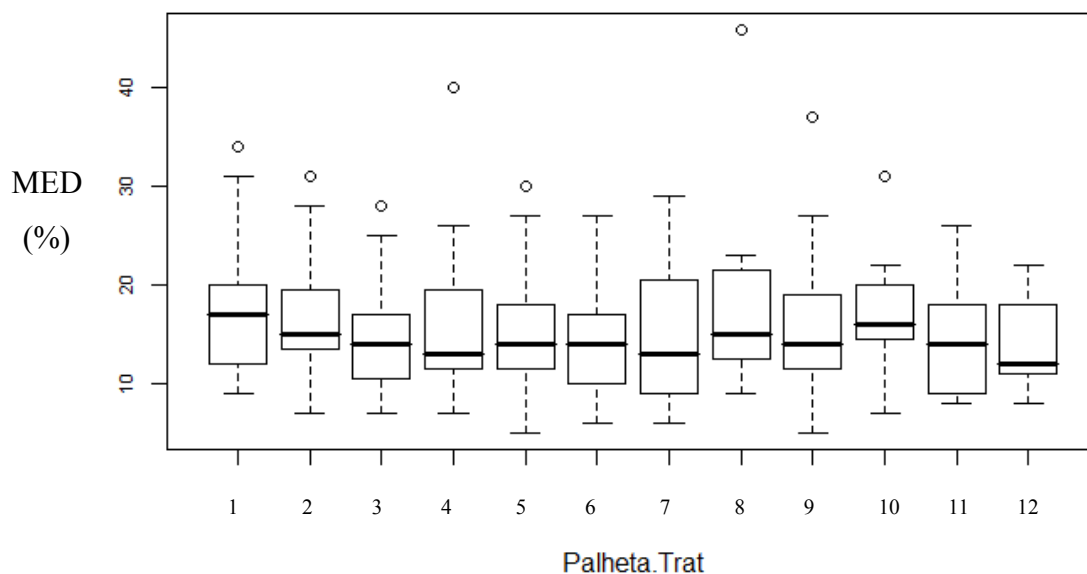


Gráfico 8: Parâmetros espermáticos de percentagem de espermatozóides Médios (MED, %) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas.

Eixo X: Palheta.Trat: **1c¹**: congelação em caixa de isopor e palheta de 0,5 mL; **2c²**: congelação em caixa de isopor e palheta de 0,25 mL; **1m120³**: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de -20°C/min; e palheta de 0,5 mL; **2m120⁴**: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de -20°C/min; e palheta de 0,25 mL; **1m140⁵**: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de -40°C/min; e palheta de 0,5 mL; **2m140⁶**: congelação em máquina taxa TK® 4000C de -40°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m220⁷**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -20°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m220⁸**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -20°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m240⁹**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -40°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m240¹⁰**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -40°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m260¹¹**: congelação em máquina Mini Digitcool®de -60°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m260¹²**: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -60°C/min e palheta de 0,25 mL.

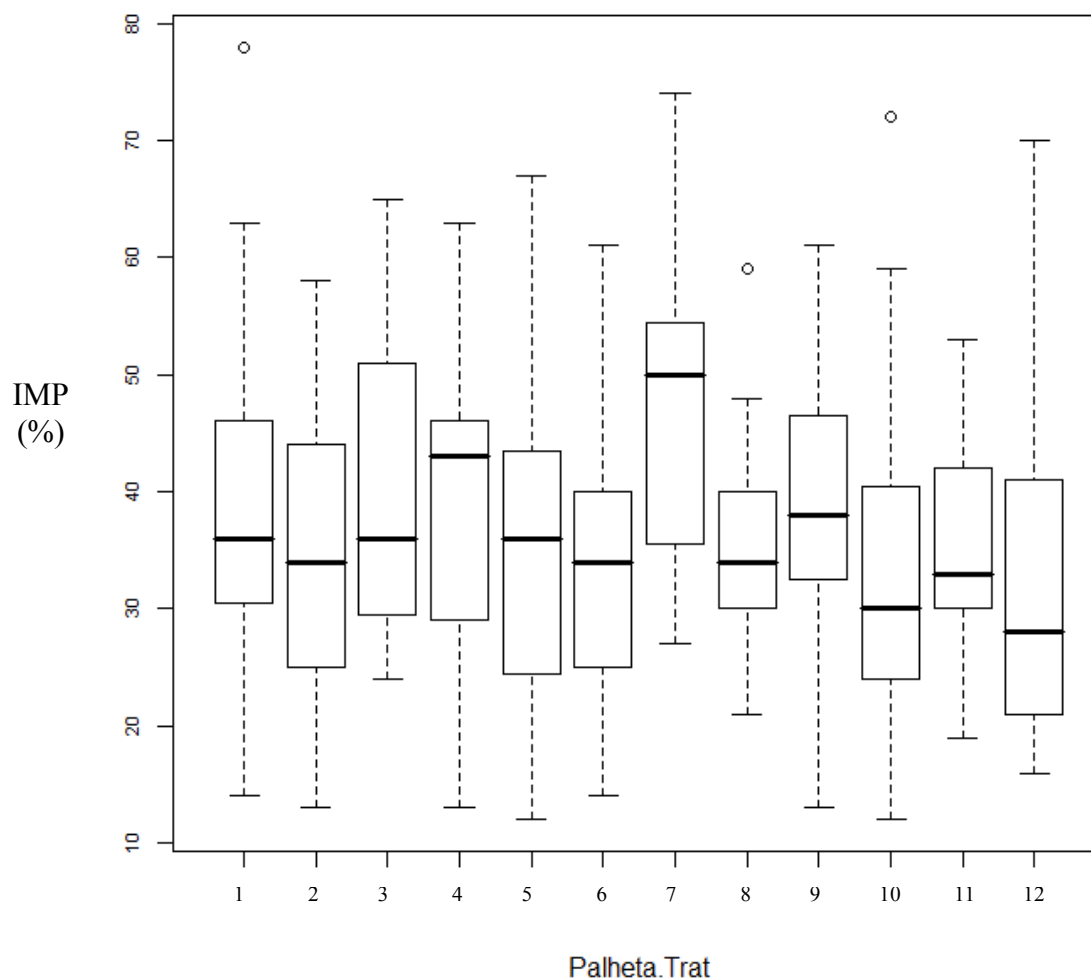


Gráfico 9: Parâmetros espermáticos de percentagem de Integridade de Membrana Plasmática (%) nos diversos protocolos de congelação e nos dois volumes de palhetas.

Eixo X: Palheta.Trat.: **1c**¹: congelação em caixa de isopor e palheta de 0,5 mL; **2c**²: congelação em caixa de isopor e palheta de 0,25 mL; **1m120**³: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de -20°C/min; e palheta de 0,5 mL; **2m120**⁴: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de -20°C/min; e palheta de 0,25 mL; **1m140**⁵: congelação em máquina TK® 4000C; taxa de -40°C/min; e palheta de 0,5 mL; **2m140**⁶: congelação em máquina taxa TK® 4000C de -40°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m220**⁷: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -20°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m220**⁸: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -20°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m240**⁹: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -40°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m240**¹⁰: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -40°C/min e palheta de 0,25 mL; **1m260**¹¹: congelação em máquina Mini Digitcool®de -60°C/min e palheta de 0,5 mL; **2m260**¹²: congelação em máquina Mini Digitcool®ZH 400 de -60°C/min e palheta de 0,25 mL.

4.2 Resultados - Experimento 2

Comparação entre os parâmetros espermáticos e a fertilidade de espermatozóides congelados em diferentes taxas de congelação.

Os valores médios e seus respectivos desvios padrão dos parâmetros espermáticos dos ejaculados dos garanhões pertencentes ao Haras Itapuã estão descritos na tabela 4. Estes animais estão classificados em A (alta congelabilidade) e B (baixa congelabilidade) e separados de acordo com o protocolo de congelação em caixa de isopor (C), máquina TK® 4000C (M1) e máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2). Os ejaculados foram congelados de acordo com o protocolo 2 e segue descrito abaixo:

- Congelamento em caixa de isopor (C): velocidade de 10°C/min entre 5°C a -60°C e velocidade de 8°C/min entre -60°C a -110°C.
- Máquina Automática TK 4000C: (M1): velocidade de 15°C/min entre 5°C a -10°C e velocidade de 40°C/min entre -10°C a -140°C.
- Máquina Automática Mini Digitcool®(M2): velocidade de 15°C/min entre 5°C a -10°C e velocidade de 40°C/min entre -10°C a -140°C.

Tabela 4: Médias \pm desvios padrão das variáveis analisadas pós-descongelamento do ganhão A (alta congelabilidade) e do ganhão B (baixa congelabilidade) nas amostras criopreservadas para a realização do teste de fertilidade.

Parâmetros espermáticos	Ganhão A			Ganhão B			Valor p (entre os ganhões)
	C	MI	M2	C	MI	M2	
MT (%)	80,0 \pm 1,4 ^a	80 \pm 0 ^a	80 \pm 1,4 ^a	48,0 \pm 5,6 ^b	65,0 \pm 2,8 ^b	60,0 \pm 8,5 ^b	0,0018
MP (%)	39,5 \pm 6,4 ^a	36 \pm 7,1 ^a	35,5 \pm 0,7 ^a	16,5 \pm 6,4 ^b	28,5 \pm 4,9 ^b	31,0 \pm 7,1 ^b	0,0307
VAP ($\mu\text{m/s}$)	111 \pm 5,6 ^a	115,5 \pm 0,7 ^a	118,5 \pm 4,9 ^a	78 \pm 2,8 ^b	97 \pm 2,1 ^b	95,5 \pm 3,5 ^b	0,004
VSL ($\mu\text{m/s}$)	85,5 \pm 7,8 ^a	86,5 \pm 3,5 ^a	89,0 \pm 4,2 ^a	64,5 \pm 3,5 ^b	75,5 \pm 4,9 ^b	76,5 \pm 3,5 ^b	0,0010
VCL ($\mu\text{m/s}$)	190,0 \pm 1,4 ^a	203,5 \pm 3,5 ^a	207,0 \pm 5,6 ^a	145,5 \pm 2,1 ^b	183,0 \pm 8,5 ^b	177,5 \pm 4,9 ^b	0,0014
RAP (%)	71,5 \pm 0,7 ^a	73,0 \pm 0 ^a	73,0 \pm 1,4 ^a	25,5 \pm 6,4 ^b	49,0 \pm 2,8 ^b	47,0 \pm 9,9 ^b	0,0012
IMP (%)	53,5 \pm 0,7 ^a	51 \pm 0 ^a	47,5 \pm 4,9 ^a	44 \pm 1,4 ^b	37 \pm 5,6 ^b	38 \pm 0 ^b	0,0014

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VAP: velocidade ao longo de uma trajetória média, VSL: velocidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, RAP: espermatozoides rápidos, IMP: células com membrana plasmática íntegra.

C: Caixa de Isopor (-10°C/min); MI: máquina TK® 4000 (-40°C/min); M2: máquina Mini Digitcool® ZH 400 (-40°C/min).

Todas as características de cinética espermática avaliada pós-descongelamento apresentaram diferenças significativas entre os ganhões A e B ($p < 0,05$), evidenciando uma grande diferença de qualidade seminal entre ganhões de alta (ganhão A) e de baixa congelabilidade (ganhão B), porém não foram observadas diferenças entre os sistemas de congelamento.

Assim, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística entre os três sistemas de congelamento ($p > 0,05$) (Tabela 4), como a caixa de isopor (C), máquina TK® 4000C (M1) e máquina Mini Digitcool® ZH 400 (M2), a utilização de ejaculados de ganhão baixa congelabilidade (ganhão B) demonstrou que os parâmetros espermáticos apresentaram uma melhora quando submetidos a uma taxa de congelamento mais rápida (taxa de $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Sendo assim, o ganhão B apresentou como motilidade total 48% em caixa de isopor, 65 % na máquina M1 e 60 % na máquina M2. Já a percentagem de motilidade progressiva foi de 16,5 % em caixa de isopor, 28,5 % na M1 e de 31,0 % na M2. E para a percentagem de espermatozoides rápidos encontrou-se 25,5 % na caixa de isopor (C), 49 % na máquina M1 e 37% na máquina M2.

As velocidades desenvolvidas pelos espermatozoides (ganhão A) também foram superiores nas máquinas 1 e 2 em comparação com a caixa de isopor, apesar de não haver diferença estatística entre os sistemas de congelamento ($p > 0,05$). Sendo valor de VAP de $78 \mu\text{m}/\text{s}$ na caixa de isopor, $97 \mu\text{m}/\text{s}$ na máquina M1 e de $95,5 \mu\text{m}/\text{s}$ na máquina M2, o valor de VSL $64,5 \mu\text{m}/\text{s}$ na caixa de isopor, $75,5 \mu\text{m}/\text{s}$ na máquina M1 e de $76,5 \mu\text{m}/\text{s}$ na M2. E finalmente o valor de VCL de $145,5 \mu\text{m}/\text{s}$ na caixa de isopor, $183 \mu\text{m}/\text{s}$ na M1 e $177,5 \mu\text{m}/\text{s}$ na máquina M2.

Na tabela 5 estão descritos os valores médios e seus respectivos desvios padrão dos parâmetros espermáticos dos ejaculados dos ganhões pertencentes do Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina “CERBEQ” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – Botucatu. Estes animais estão classificados em C (baixa congelabilidade) e D (alta congelabilidade) e separados de acordo com o protocolo de congelamento do Grupo 2 (taxa de congelamento de $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Para a realização das inseminações artificiais foi utilizado um “pool” de ejaculados por cada inseminação realizada, ou seja, duas palhetas de cada ganhão, cada uma delas com concentração de 100×10^6 espermatozoides totais.

Tabela 5: Médias \pm desvios padrão das variáveis analisadas pós-descongelamento dos animais C (baixa congelabilidade) e dos animais D (alta congelabilidade) nas amostras criopreservadas no protocolo 2 para a realização do teste de fertilidade.

Parâmetros espermáticos	Garanhões C			Garanhões D			Valor p (entre os garanhões)
	C	M1	M2	C	M1	M2	
MT (%)	63,5 \pm 2,1 ^a	73,0 \pm 11,3 ^a	68,0 \pm 0,7 ^a	83,5 \pm 3,5 ^b	81,5 \pm 3,5 ^b	74,0 \pm 0 ^b	0,0122
MP (%)	23,5 \pm 0,7 ^a	27 \pm 5,7 ^a	26,5 \pm 0,4 ^a	40,5 \pm 7,8 ^b	40,5 \pm 7,8 ^b	39,0 \pm 2,8 ^b	0,0237
VAP (μ m/s)	89,0 \pm 7,1 ^a	93 \pm 1,4 ^a	92,5 \pm 3,9 ^a	100,0 \pm 7,1 ^b	107,5 \pm 4,9 ^b	97,5 \pm 9,2 ^b	0,0049
VSL (μ m/s)	69,0 \pm 4,2 ^a	70,0 \pm 0 ^a	71,5 \pm 1,8 ^a	76,5 \pm 6,4 ^b	82,0 \pm 7,1 ^b	73,0 \pm 7,1 ^b	0,0348
VCL (μ m/s)	170,0 \pm 12,7 ^a	181 \pm 9,9 ^a	180,5 \pm 8,1 ^a	182,5 \pm 2,1 ^b	194,0 \pm 2,8 ^b	179,5 \pm 9,2 ^b	0,1216
RAP (%)	43,0 \pm 2,8 ^a	53,5 \pm 7,8 ^a	49,0 \pm 1,4 ^a	72 \pm 9,9 ^b	72,5 \pm 13,4 ^b	58,5 \pm 3,5 ^b	0,0046
IMP (%)	37,5 \pm 2,1 ^a	39,0 \pm 14,1 ^a	35,5 \pm 1,8 ^a	49,5 \pm 2,1 ^a	45,5 \pm 0,7 ^a	43,2 \pm 1,3 ^a	0,4094

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VAP: velocidade ao longo de uma trajetória média, VSL: velocidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, RAP: espermatozoides rápidos, IMP: células com membrana plasmática íntegra.

C: Caixa de Isopor (-10°C/min); M1: máquina TK® 4000 (-40°C/min); M2: máquina Mini Digitool® ZH 400 (-40°C/min).

Não foi observado efeito significativo da metodologia de congelamento sobre as taxas de concepção, entre os ganhões A, B e o “pool” dos ejaculados dos ganhões (ganhões C e D) ($p > 0,05$).

Tabela 6: Efeito do protocolo de congelamento utilizado sobre o efeito do ganhão.

	Valor p
Efeito do Protocolo (X1)	0,8205
Efeito do Ganhão (X2)	0,0786

Onde $\text{Logit } P_i = 0,8487 - (0,097 \text{ X1}) + (0,7724 \text{ X2})$ sendo **X1** o efeito do protocolo e **X2** o efeito do ganhão.

Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística entre os dados, houve uma tendência do efeito do ganhão $0,05 < p < 0,10$ sobre as taxas de concepção, segundo os valores de p descritos na tabela 6. A justificativa por não ter ocorrido este efeito significativo fica por conta do baixo número de inseminações, embora os resultados sugiram que o “pool” de sêmen dos ganhões pertencentes ao Departamento de Reprodução da FMVZ é mais efetivo no aumento dos índices de fertilidade.

Na tabela 7 estão apresentados os dados de taxa de concepção obtidos nas três metodologias de congelamento. Quando o ejaculado foi congelado em caixa de isopor (C) obteve-se uma taxa de gestação média de 58,33% (12), num total de 35 éguas inseminadas. Na criopreservação do sêmen equino no sistema automatizado TK® 4000 C (M1) teve-se 61,54% (13) de taxa de prenhez e na máquina Mini Digitcool® uma percentagem de 50 (10) do total de éguas inseminadas.

Tabela 7: Taxa de Concepção em percentagem (%) nos três sistemas de congelamento utilizados: caixa de isopor, máquina TK® 4000 C e máquina Mini Digitcool® ZH 400.

Protocolo	Taxa de Concepção	
	Concepção (%)	n
C ¹	58,33	12
M1 ²	61,54	13
M2 ³	50,00	10

C¹: caixa de isopor, M1²: máquina TK® 4000 C; M2³: máquina Mini Digitcool®.

Diante dos resultados encontrados nos exames laboratoriais e pelo histórico reprodutivo dos animais, observa-se que as taxas de concepção encontradas com a utilização do “pool” dos ejaculados dos garanhões da FMVZ apresentaram um aumento no número de gestações obtidas, assim como nos índices de prenhez encontrados pelo garanhão A, o qual apresenta alta congelabilidade.

Assim, foi realizado o teste estatístico, no qual se comparou o efeito dos garanhões utilizados no “pool” e o garanhão A (alta congelabilidade) versus o garanhão B (baixa congelabilidade), independentemente do sistema de congelação utilizado. Estes dados estão descritos na tabela 8.

Tabela 8. Descrição dos garanhões utilizados no teste de fertilidade, número de inseminações realizadas e taxas de concepção obtidas.

Garanhões	número de inseminações	número de prenhezes	taxa de concepção (%)
B	18	8	44,44 ^a
A + “pool”	17	12	70,59 ^a

Letras diferentes entre as colunas indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Embora exista uma diferença entre as taxas de concepção obtidas, esta não foi significativa para protocolo de congelação ou para garanhão. Uma informação interessante é que a probabilidade de se obter uma prenhez com a utilização do ejaculado do garanhão A (alta congelabilidade) ou com o “pool” dos ejaculados é quase 3 vezes maior (Tabela 9, odds ratio) do que ao se utilizar o ejaculado do garanhão B (baixa congelabilidade).

Tabela 9. Efeito do protocolo de congelação e do garanhão sobre as taxas de concepção.

Variáveis	p	Odds ratio
Protocolo de congelação (X1)	0,9015	0,9493
Garanhão (X2)	0,1244	2,992

5. Discussão

No presente estudo foram comparados diferentes protocolos de congelação de sêmen equino, em dois tipos de palhetas francesas, de 0,5 e de 0,25 mL. Das avaliações espermáticas pós-descongelação não foram encontradas diferenças estatísticas entre os protocolos de congelação utilizados, tanto dos parâmetros analisados pelo sistema computadorizado *CASA* como dos parâmetros avaliados pelo microscópio de epi-fluorescência.

Entretanto, quando comparados os dois volumes de armazenamento de sêmen, em palhetas de 0,5 e de 0,25 mL observaram-se diferenças estatísticas. Isto demonstra que ocorreu uma alteração da qualidade seminal quando os espermatozóides foram armazenados em diferentes volumes, mesmo com a mesma concentração espermática por palheta. Sendo assim, quanto às características de cinética espermática deduz-se que palheta de 0,5 mL apresenta melhor qualidade seminal que de 0,25 mL.

Quanto a qualidade seminal, Nascimento et al. (2008) observou que apenas a variável de retilinearidade (STR) apresentou um maior valor médio em palheta de 0,5 mL que a de 0,25 mL, enquanto que a velocidade curvilínea (VCL) foi maior em 0,25 mL, pelas avaliações pelo sistema computadorizado *CASA*. Todas as demais informações advindas desta tecnologia sugerem uma igualdade na qualidade espermática pós-descongelação no armazenamento em palhetas de 0,5 e 0,25 mL. Estes resultados divergem dos resultados obtidos neste estudo, em que ficou claro uma alteração da qualidade seminal entre palhetas de 0,5 e 0,25 mL, mostrando uma inferioridade dos parâmetros espermáticos em palhetas de 0,25 mL. Diferentemente do nosso estudo, em que foi utilizado um período de refrigeração a 5°C por 20 minutos, Nascimento et al. (2008) utilizou um tempo de refrigeração em torno de 80 minutos. Assim, é possível que este tempo de refrigeração maior possa ter acarretado em um resultado disperso dos obtidos neste experimento.

Adicionalmente, diferente dos resultados obtidos no presente estudo, em que palhetas de 0,5 mL apresentaram valores de cinética espermática superiores a palhetas de 0,25 mL, Dell'Aqua Jr. et al. (2001) quando compararam os resultados laboratoriais de sêmen equino criopreservado em palhetas de 0,5 e 0,25 mL observaram valores superiores de cinética espermática em palhetas de 0,25 mL. Entretanto, a metodologia de manipulação dos ejaculados foi diferente da realizada no presente estudo, estes autores utilizaram o meio de congelação M9H na diluição de 200×10^6 células

espermáticas viáveis por mL e submetidos a um período de refrigeração a 5°C por 1 hora.

Corroborando com os dados obtidos neste estudo, Nothling e Shuttleworth (2005) encontraram melhores parâmetros espermáticos em sêmen canino pós-descongelamento em palhetas de 0,5 mL do que em 0,25 mL. Estes autores utilizaram também diferentes taxas de congelamento com dois níveis de distância do vapor de nitrogênio líquido, a 3,5 e a 8,0 cm e concluíram não haver diferença entre os parâmetros espermáticos, nestas diferentes taxas. Este estudo preconizou um período de estabilização de 20 minutos a 5°C similar ao presente estudo.

Clulow et al. (2008), diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, observaram similaridade entre os parâmetros espermáticos como motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), morfologia e integridade de acrossomo em dois volumes de armazenamento de sêmen equino, palhetas de 0,5 e 0,25 mL. Entretanto, assim como no presente estudo, estes autores observaram que o método de congelamento em caixa isotérmica (Styrofoam® Box) e em máquina de congelamento programada (Planer Kryo 10 series III - Planer Products, Middlesex, UK), em diferentes taxas de congelamento, possibilitaram a manutenção da viabilidade dos espermatozoides equinos, com valores similares de cinética espermática entre as duas metodologias.

Igualmente ao presente estudo, Maxwell et al. (1995) observaram que sêmen de carneiro congelado em palheta de 0,5 mL, apresentaram motilidade espermática (MT, %) superior a palhetas de 0,25 mL. Estes autores hipotetizaram que a diferença na área de superfície entre o dois volumes de palhetas resultam em uma menor taxa de congelamento para palhetas de maior volume, a qual beneficia a sobrevivência dos espermatozoides ovinos. Sendo assim, espermatozoides equinos apresentam uma taxa de congelamento menor em palheta de 0,5 mL, por ter uma maior área de superfície entre as células criopreservadas, apresentando um melhor índice de sobrevivência espermática (STEVENSON et al., 2009)

Assim como neste estudo, Senger et al. (1983) verificaram que as taxas de congelamento, em diferentes volumes de palheta, apresentaram uma interação com a motilidade espermática obtida. Estes autores concluíram que o sêmen envasado em palhetas francesas de 0,5 mL apresentou uma melhor qualidade espermática pós-descongelamento do que as palhetas de 0,25 mL. Ademais, apesar de menores volumes, teoricamente apresentarem melhores parâmetros espermáticos pós-descongelamento pela maior homogeneidade na distribuição da temperatura entre os espermatozoides, estes

autores sugerem que os estudos sejam aprimorados, a fim de se obter um protocolo de congelação ideal.

As percentagens de espermatozóides com membrana plasmática íntegra não diferiram entre os protocolos de congelação como também entre os dois volumes de armazenamento. Embora haja uma correlação positiva entre a motilidade espermática e a percentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra (DELL'AQUA JR. et al., 2001), este estudo demonstra que as taxas e os diferentes sistemas de congelação preconizados interferiram na maioria das variáveis de cinética espermática obtidas pelo equipamento *CASA*, mas não integridade da membrana plasmática. Tem-se então, que existam outros fatores na estrutura da célula que interfira na qualidade de seu deslocamento, como a estrutura flagelar.

Autores descreveram que os crioprotetores, como o glicerol, alteram a polimerização e despolimerização de microtubos do citoesqueleto (KEATES, 1980). Desse modo, a estrutura flagelar do espermatozóide possivelmente também é afetada por agentes crioprotetores, já que é composto por nove microtúbulos duplos periféricos e dois microtúbulos centrais (NASCIMENTO et al., 2008).

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, Dell'Aqua Jr. et al. (2001) observaram uma melhor integridade de membrana plasmática por microscopia de epifluorescência e pelo teste hiposmótico em ejaculados criopreservados em palhetas de 0,25 mL. Possivelmente, estes resultados mostram uma diferença na qualidade seminal das amostras congeladas em meios crioprotetores diferentes. No presente estudo, utilizou-se um meio diluente do grupo das amidas (dimetilformamida) que por apresentar menor peso molecular e por ser mais permeável ao espermatozóide acarretam a menos injúrias pela maior proteção a célula e talvez esteja mais adaptado ao uso em palhetas de 0,5 mL (MEDEIROS, 2007; PASQUINI et al., 2007).

Com relação ao protocolo de congelação utilizado neste experimento, os parâmetros espermáticos nos sistemas automatizados, que possibilitam um melhor controle da taxa de congelação, apresentaram similaridade com os resultados obtidos no método convencional na caixa de isopor.

Assim, os resultados deste estudo mostram que as taxas mais rápidas ($-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$), intermediárias ($-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e mais lentas (-8 a $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$) acarretam a valores similares de qualidade seminal pós-descongelação. Talvez esses valores estejam diretamente relacionados ao tipo de crioprotetor utilizado, como também com a proporção de crioprotetor/espermatozóide. Durante a congelação, os espermatozóides

são direcionados para os canais de soluções não congeladas entre os cristais de gelo. Estes canais tornam-se progressivamente mais estreitos com a diminuição da temperatura (NASCIMENTO et al., 2008). Tais canais são de extrema importância durante a criopreservação, pois 15% da água extracelular é mantida não-congelada favorecendo a sobrevivência dos espermatozóides. Assim, quanto maior a quantidade de moléculas crioprotetoras por célula, maior a percentagem de canais de água não-congelada, ocasionando melhor qualidade seminal pós-descongelação (DEVIREDDY et al., 2002).

As três metodologias testadas e as taxas de congelação mais rápidas, permitiram a obtenção de bons resultados pós-descongelação. Os dados obtidos de motilidade total (MT, %) foram similares aos obtidos por De Vita (2008) quando comparou taxas de congelação em sistema automatizado (TK® 3000) e em caixa de isopor. Este autor verificou que metodologias de congelação em taxas mais rápidas, permitiram eficiente taxa de congelabilidade em espermatozóides equinos. Concluindo assim, que a utilização de animais com sêmen tanto de alta como de baixa congelabilidade e a utilização do meio diluente Botu-Crio® permitiram a obtenção de resultados satisfatórios de parâmetros espermáticos pós-descongelação.

Este presente estudo utilizou taxas de congelação, entre $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Apesar disto, os resultados de cinética espermática e de integridade espermática pós-descongelação foram similares. Da mesma forma, Devireddy et al. (2002) relataram uma ampla taxa congelação de sêmen equino de $-29^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (sem adição de crioprotetores) a taxas de $-69^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (com adição de crioprotetor a base de glicerol) com a manutenção da viabilidade celular.

Estes achados corroboram com os dados descritos por Papa et al. (2003), que não observaram diferenças de motilidade e integridade de membrana plasmática pós-descongelação de espermatozóides equinos congelados em diferentes alturas do nitrogênio líquido (1, 3, 6 e 9 cm), deste modo em diferentes taxas de congelação.

Para o teste de fertilidade, foi utilizada a taxa de congelação obtida na caixa de isopor ($-8^{\circ}\text{C}/\text{min}$) e as taxas de congelação nas máquinas automatizadas foram de $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Para as máquinas automatizadas, escolheu-se essa taxa por ser a mais rápida da máquina da TK® 4000 e a taxa similar da máquina Mini Digitcool® ZH 400.

A análise estatística demonstrou não haver diferença entre os índices de prenhez obtidos com o sêmen congelado nas máquinas (61,54% na máquina TK® 4000 e 50,0% na máquina Mini Digitcool® ZH 400) e na metodologia usual em caixa de isopor

(58,33%). Esta similaridade de resultados possivelmente se deve ao baixo número de inseminações realizadas, por se tratar de uma criação comercial, em que não foi possível a repetição das metodologias.

Entretanto, as taxas de concepção obtidas neste estudo, foram similares as encontradas por De Vitta (2008), em que foram obtidos 65% de taxa de prenhez com uso do sêmen congelado pela máquina TK® 3000 e 60% de prenhez com a metodologia usual em caixa de isopor, mostrando que as duas metodologias foram eficientes.

Os dados de fertilidade obtidos quando da utilização dos ejaculados do “pool” da FMVZ e do garanhão A (alta congelabilidade) apresentaram uma tendência de maior taxa de concepção. Estes dados confirmam que existe uma correlação entre os dados observados na avaliação espermática laboratorial com os resultados de fertilidade.

Sobre a utilização do “pool” de ejaculados para o teste de fertilidade, observou-se que os garanhões de alta congelabilidade apresentam uma superioridade de índices de gestação em comparação com ejaculados de garanhões de baixa congelabilidade, mostrando que existe uma correlação entre “bons congeladores” e taxas elevadas de concepção.

6. Conclusão

Considerando os dados obtidos neste experimento, conclui-se que a criopreservação de espermatozóides equinos é alterada pelo volume da palheta utilizada, de 0,5 ou de 0,25 mL, de modo que há uma diminuição da qualidade seminal em palhetas de menor volume, ou seja, de 0,25 mL, independentemente do protocolo de congelação utilizado.

Observou-se ainda que taxas mais rápida de congelação apresentam similaridade com as mais lentas, e que o método convencional de congelação de sêmen em caixa de isopor apresenta parâmetros espermáticos semelhantes a aparelhos automatizados.

Com relação ao teste de fertilidade dos animais, por termos a disponibilidade de um pequeno número de fêmeas, não foi possível detectar diferenças estatísticas entre os protocolos de congelação utilizados. Porém, observou-se que os animais que apresentam ejaculados com alta congelabilidade apresentaram maior taxa de concepção nas fêmeas inseminadas.

7. Referências

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. **Biologia molecular da célula**. 3 edição, Editora Artes Médicas, p. 1294, 1997.

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

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**. v.89, p.105-13, 2005.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Science**, v. 7: 3, p.145-173, 1987.

ANGOLA, A.P.; MENDEZ, J.V.; QUINTERO, L.Z. Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y La motilidad pos descongelación del semen equino. **Veterinária Mexico XXIII**, v. 44, p. 315-318, 1992.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozóides equinos pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. São Paulo, 2000. Tese Livre Docência – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

ARRUDA R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; SOUZA, L.W.O.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; GARCIA A.R. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (Supl 1), p. 145-150, 2005.

ARRUDA, R. P.; VIEIRA, R. C.; VALENTE FILHO, J. B.; VISINTIN, J. A.; NEVES NETO, J. R. Utilização de uma seringa modificada para a aplicação do sêmen equino

congelado em bainhas plásticas e macrotubos. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 10, n. 2, p. 242, 1994.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107 (3-4), p. 268-275, 2008.

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

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. 1 edition. **Iwoa State University Press**, Ames, Iwoa, p. 285, 1989.

BERGERON, A.; VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. **Molecular of Reproduction Development**, v. 71, p. 461–470, 2005.

BLANES, M.S.; PAPA, F.O.; DORES, C.B.; MELO, C.M.; CROCCI, A.J. Influência do número de espermatozoides e tempo de estabilização na congelação de sêmen equino utilizando-se diluente Botu-Crio. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, Suplemento 1, v. 33, p. 303, 205.

BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v. 54, p. 129-136, 2000.

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-Kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1293–1301, 1997.

CHAVEIRO, A.; MACHADO, L.; FRIJTERS, A.; ENGEL, B.; WOELDERS, H. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bulls sperm using two osmotic supports. **Theriogenology**, v. 65, p. 1875-1890, 2006.

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

DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen, **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 344-346, 2001.

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

DE VITA, B. **Efeito de diferentes sistemas e taxas de congelação na eficiência da congelabilidade e fertilidade do sêmen equino**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGLAS, M.S.J.; MERYMAN, H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction. In search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v.27, p.247-68, 1990.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysics**, v.1469, p. 197-235, 2000.

FURST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino**. Viçosa, 2006, Tese, Universidade Federal de Viçosa.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 131-147, 1996.

GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 2000. **Proceedings...** Stockholm, 2000 p.307.

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

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

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

HOLT, W.V. Basics aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 03-22, 2000.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.39, p.1-8, 2002.

JOSHI, N.; MEDINA, H.; CRÚZ, I.; OSUNA, J. Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by atomic force microscopy. **Fertility and Sterility**, v.75, n.5, p.961-66, 2001.

KEATES, R.A. Effects of glycerol on microtubs polymerization kinetics. **Biochemistry and Biophysical Research Communication**, v. 97, p. 1163-1169, 1980.

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

LOOMIS, R. P.; CLARK, J. S. Motion characteristic of frozen-thawed equine spermatozoa packed in 0,5 mL straws at various concentration. **Society for Theriogenology. Proceedings for annual Meeting**, Baltimore, p. 142, 1998.

LOVE, C.C.; LOCH, W.L.; BRISTOL, F.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging methods. **Theriogenology**, v. 31, n. 3, p. 613-622, 1989.

MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GUNTZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl. 27, p. 47-51, 1979.

MARTÍNEZ-RODRÍGUES, H. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia. **Anais: Palestra**. Goiânia: Goiás, p.1-8, 2005.

MAXWELL, W. M. C.; LANDERS, A.J.; EVANS, G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. **Theriogenology**, v. 43, p. 1201-1210, 1995.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, p. 125-142, 1984.

MEDRANO, A.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. **Andrologia**, v. 41; p. 246–250, 2009.

MEDEIROS, A. S. L. **Resistência osmótica, congelabilidade e fertilidade de sêmen de garanhões frente a diferentes crioprotetores**. Botucatu, 2007, Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

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

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

MORREL, J. M.; JOHANNISSON, A.; JUNTILLA, L.; RYTTY, K.; BÄCKGREN, L.; DALIN, A. M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Stallion sperm viability, as measured by nucleocounter SP-100, is affected by extender and enhanced by single layer centrifugation. **Veterinary Medicine International**, p. 1-7, 2010.

MORRIS, G.J.; FASZER, K.; GREEN, J.E.; DRAPER, D.; GROUT, B.W.W.; FONSECA, F. Rapidly cooled horse spermatozoa: Loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. **Theriogenology**, v. 68, p. 804-812, 2007.

NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ALONSO, M.A.; CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrossomal and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 6, p. 351-358, 2008.

NOTHLING, J.O.; SHUTTLEWORTH, R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 1469-1480, 2005.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; MACÍAS-GARCIA, B.; GALLARDO-BOLAÑOS, J. M.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 114, 393-403, 2009.

PAPA, F. O., GABALDI, S. H., WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n.1, p.39-44, 2000.

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

PAPA, F. O.; SANTOS, T. B.; MACEDO, L. P.; 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 congelação sobre os parâmetros espermáticos de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 366-370, 2003.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA Jr, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 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 equino congelado com três dos diluentes mais utilizados no mundo. **Acta Veterinary Research**, Suplemento 3, v. 35, p. 1007, 2007.

POLGE, C.; SMITH, A.U.; PARKS, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 15, p. 164-666, 1949.

SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.77-111, 2000.

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

SENGER, P.L. ; MITCHELL, J.R. ; ALMQUIST, J.O. Influence of cooling rates and extenders upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in 0.25 and 0.5 mL French straws. **Journal of Animal Science**, v. 56, n. 6, 1983.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Principles of cryopreservation. **In: Cooled and Frozen Stallion Semen**, b. 9, 1999.

STEVENSON, J.S.; HIGGINS, J.J.; JUNG, Y. Pregnancy outcome after insemination of frozen-thawed bovine semen packaged in two straw sizes: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4432-4438, 2009.

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, p.101-113, 2003.

VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a sperm's eye view - Revisiting Our Perception of This Intriguing Cell. **AAEP Proceedings**, v. 53, 2007.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. **Acta Science Veterinary**, v. 35 (Suplemento 3), p. 915-919, 2007.

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

VIERTH, G. L. Congelacion de semen equino: procesamiento em pellets y pajuellas. **Archives of Veterinary Medicine**, v. 11, p. 123, 1979.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility whit cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-482, 2000.

WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; ENGEL, B. Effects of trehalose and sucrose, osmolarity of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bulls sperm after freezing and thawing. **Cryobiology**, v. 35, p. 93-105, 1997.

8. Anexos

ANEXO 1: Descrição dos constituintes das soluções estoque utilizadas no preparo da solução de trabalho utilizada na técnica de avaliação da integridade de membrana plasmática do sêmen congelado.

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

¹ P 4170 – Sigma

² C 5041 – Sigma

ANEXO 2: Constituintes da solução de trabalho utilizada na avaliação de integridade de membrana plasmática do sêmen equino.

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

ANEXO 3: Normas para apresentação de trabalho à Revista “Veterinária e Zootecnia”

Artigos Científicos

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa em chamada de rodapé;

- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, do lado direito da página. Digitá-los, separados por linha, com chamadas de rodapé numeradas e em sobrescrito, que indicarão o cargo e endereço profissional dos autores, seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;

- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;

- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data da aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto de ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1.5, começando por RESUMO. O abstract e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.

- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, key words e palabras-clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

Introdução: Deve ser clara e objetiva e relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do trabalho.

Material e Métodos: Devem oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos utilizados, inclusive os estatísticos.

Resultados: Apresentação dos resultados obtidos, que devem ser descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a forma de tabelas, em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e encabeçadas pelo título, de acordo com as normas de apresentação tabular da ABNT/WBR 6023/2000 da Associação Brasileira de Normas Técnicas, identificadas no texto como Tabela; sob a forma de figuras, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas e algarismos arábicos, até no máximo de seis e citadas no texto como Figura. Devem ser identificadas em folha à parte, onde deve constar o título do artigo. Fotografias podem ser em preto e branco ou coloridas, identificadas com o (s) nome (s) do (s) autor (es) no verso. No caso de desenhos originais, a impressão deve ser em papel adequado, de qualidade.

Discussão: Deve ser entendida como a interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente, apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão poderão ser apresentados conjuntamente.

Conclusões: É a síntese final, fundamentada nos resultados e discussão.

Referências: Devem ser apresentadas de acordo com as normas de Vancouver (<http://www.icmje.org/>).

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para a edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, em três vias (uma original e duas cópias) impressas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas em folhas separadas. Encaminhar cópia em disquete 3 ½ de alta densidade ou CD, identificado com título do artigo e nome dos autores. Nas cópias deve (m) ser omitido (s) o (s) nome (s) do (s) autor (es), o local onde se realizou o trabalho, bem como o rodapé.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis em formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as

normas anteriores. Não devem exceder 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após a escrita por extenso na primeira utilização.

9. Trabalho científico

Enviado à Revista “Veterinária e Zootecnia”.

COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES SISTEMAS DE CONGELAÇÃO E VOLUMES DE ARMAZENAMENTO DE SÊMEN NA VIABILIDADE ESPERMÁTICA EM GARANHÕES DE ALTA E BAIXA CONGELABILIDADE

Rosiára Rosária Dias Maziero¹

Bruno Ribeiro Avanzi¹

Gabriel Augusto Monteiro¹

Priscilla Nascimento Guasti²

André Maciel Crespilho³

Frederico Ozanam Papa⁴

rosiaramaziero@yahoo.com.br; telefone/fax (14) 3811 6249; Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-000 Botucatu-SP.

¹ Mestre em Reprodução Animal pelo Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

² Mestranda em Reprodução Animal pelo Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

³ Doutorando em Reprodução Animal pelo Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

⁴ Professor Titular do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Distrito de Rubião Júnior, s/n, CEP: 18618-000, Botucatu-SP.

1 **COMPARISON OF DIFFERENT SYSTEMS FREEZING AND SEMEN**
2 **STORAGE VOLUME ON SPERM VIABILITY OF POOR AND GOOD**
3 **FREEZER STALLIONS**
4

5 **ABSTRACT**
6

7 The experiment aimed to evaluate the motility pattern using a computer-assisted sperm
8 analysis (CASA) and plasma membrane integrity by epifluorescence microscopy of
9 equine semen that were frozen in 0.5 and 0.25 mL straws at different systems freezing
10 and their relationship with sperm viability. Three different methodologies were used:
11 conventional method with isothermic box and two automated systems: the Mini
12 Digitcool® machine (IMV - Technologies – France). Therefore 3 ejaculates per 4
13 animals were used for each freezing protocol. We compared isothermic box *vs.* TK®
14 4000C machine at a -40°C/min rate *vs.* Mini Digitcool® at a -40°C/min rate. The 0.5 mL
15 straw samples were thawed at 46°C/20sec whereas samples from the 0.25 mL straws
16 were thawed at 46°C/15sec for post-thawing analysis. Statistical analysis from evaluated
17 parameters was performed using the statistics software SAS 9.1. At first, it was used the
18 descriptive analysis Box Plot R program using Proc. MIXED ($p < 0.05$). There was no
19 interaction effect between freezing methodologies and freezing rates, however,
20 statistical differences were observed between the two straw volumes. The 0.5 mL straws
21 presented superior values for total motility (TM, %), progressive motility (PM, %),
22 angular progressive velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), progressive velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), track
23 speed (VCL, $\mu\text{m/s}$) and percentage of rapid sperm (RAP, %) when compared to values
24 from 0.25 mL straws. Thus, we concluded that equine sperm cryopreserved in 0.5 mL
25 straw presented superior values for kinect parameters. Additionally, concluded that
26 automated systems, lead similar results for sperm quality cryopreservation in a
27 conventional isotherm box.

28
29 **Keywords:** Equine. Semen. Cryopreservation. Volume. Freezing rate.
30
31
32
33
34
35

1 **INTRODUÇÃO**

2 O Brasil é um dos países que mais geram produtos utilizando biotecnologias da
3 reprodução (1), porém com resultados muito variáveis. Para isso, o desenvolvimento de
4 técnicas para a preservação e estocagem de sêmen possibilita o melhor aproveitamento
5 de animais geneticamente superiores, favorece o armazenamento de material genético
6 daqueles animais ameaçados de extinção, além de permitir o transporte de sêmen a
7 longas distâncias e controlar as doenças sexualmente transmissíveis.

8 Entretanto, os danos provocados pela criopreservação são irreversíveis à
9 integridade estrutural, bioquímica e biofísica da célula espermática resultando assim, em
10 menores taxas de fertilidade (2). Desse modo, métodos que evitem ao máximo lesões à
11 célula espermática são aprimorados desde a descoberta do efeito crioprotetor do glicerol
12 por Polge et al. (3).

13 Além dos crioprotetores, a taxa de refrigeração, protocolo de congelação e
14 descongelação são fatores determinantes para o sucesso desta biotecnologia e
15 contribuem para uma menor variabilidade nas taxas de prenhez (4). Assim, sistemas
16 automatizados de controle da queda de temperatura durante o processo de
17 criopreservação vêm sendo desenvolvidos, todavia ainda apresentam custo elevado e de
18 difícil manipulação, principalmente pela maioria dos aparelhos não serem portáteis.

19 Deste modo, este trabalho teve como objetivo comparar a viabilidade
20 espermática de garanhões de alta e baixa congelabilidade em diferentes sistemas de
21 congelação, na metodologia convencional em caixa de isopor, nos aparelhos
22 automatizados nacional TK® 4000C (TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba,
23 Minas Gerais, Brasil) e em equipamento importado Mini Digitcool® ZH400 (IMV
24 Technologies, França), nas palhetas francesas de 0,5 e 0,25mL.

25

1 MATERIAL E MÉTODOS

2 Animais

3 Foram utilizados 04 garanhões, de raças variadas (Árabe, Hannoverano,
4 Mangalarga Marchador e Westfallen), sob regime regular de colheita de sêmen,
5 pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina – “CERBEQ”, vinculado
6 ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de
7 Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, SP.

8

9 Colheita dos ejaculados

10 As colheitas de sêmen foram realizadas em manequim com vagina artificial
11 modelo “Botucatu” (Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil), totalizando 03
12 ejaculados de cada garanhão.

13

14 Processamento e criopreservação das amostras

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

24 Para criopreservação dos ejaculados empregou-se a técnica descrita por Papa *et*
25 *al.* (2002), na qual cada ejaculado foi diluído em meio diluente à base de leite desnatado

1 e glicose (Botu-Sêmen[®], Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil) em uma
2 proporção de 1:1 (meio:sêmen) e centrifugado a 600 g por 10 minutos. Após a
3 centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os *pellets* ressuspensos para a
4 concentração de 100×10^6 de espermatozoides totais no meio diluente de congelação
5 Botu-Crio[®] (Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil).

6 Após a adição do diluente de congelação e adequada homogeneização, as
7 amostras de sêmen foram envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL e de 0,25 mL,
8 previamente identificadas com o nome do garanhão, partida da colheita do ejaculado e o
9 sistema de congelação, e em seguida lacradas com álcool polivinílico.

10 O total de palhetas foi dividido em 3 partes, uma parte destinada a congelação
11 em caixa de isopor, outra parte destinada a congelação na máquina automatizada Mini
12 Digitcool[®] ZH 400 (IMV Technologies, França) e as palhetas restantes submetidas a
13 congelação na máquina automatizada TK[®] 4000C (TK Tecnologia em Congelação
14 Ltda, Uberaba, Minas Gerais, Brasil).

15 Assim, as palhetas foram distribuídas em uma grade e resfriadas a 5° C por 20
16 minutos em geladeira Minitub[®] (Minitub do Brasil Ltda). Decorrido este período, a
17 grade contendo as palhetas foram transferidas para os devidos sistemas de congelação.

18 A congelação na caixa de isopor foi realizada utilizando uma caixa isotérmica de
19 42 litros com 3,5cm de nitrogênio (N₂) líquido e as palhetas dispostas horizontalmente a
20 6 cm acima do nível do N₂, com uma taxa de congelação na velocidade de - 10° C/min
21 entre 5° C e -60° C e velocidade de - 8° C/min entre -60° C e -100° C.

22 Os equipamentos automatizados Mini Digitcool[®] ZH 400 (IMV - Technologies -
23 França) e TK[®] 4000C (TK Tecnologia em Congelação) obedeceram ao seguinte
24 protocolo:

1 • Máquina Automática TK® 4000 C: velocidade de -15°C/min entre 5° C a -10° C
2 e velocidade de - 40° C/min entre -10°C a -140°C.

3 • Máquina Automática Mini Digitcool® ZH 400: velocidade de - 15° C/min entre
4 5° C a -10° C e velocidade de - 40° C/min entre -10° C a -140° C.

5 Após realizada a taxa de congelação, as palhetas francesas foram mergulhadas
6 em nitrogênio líquido a -196° C, colocadas em *globettes* devidamente identificados de
7 acordo com o protocolo de congelação e então armazenados em botijões criogênicos.

8

9 **Descongelação das amostras e avaliações espermáticas**

10 Para as palhetas de 0,5 mL a descongelação foi realizada a 46° C por 20
11 segundos. Já para as palhetas de 0,25 mL a descongelação foi realizada a 46° C por 15
12 segundos, de acordo com o proposto por Dell'Aqua Jr. et al. (5). Para análise das
13 amostras de sêmen criopreservado empregou-se a avaliação computadorizada *CASA*
14 considerando as seguintes variáveis: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva
15 (MP, %), percentagem de espermatozóides rápidos (RAP, %), velocidade ao longo de
16 uma trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade
17 curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$).

18 Adicionalmente, foi realizada a análise de integridade da membrana plasmática
19 (IMP, %) empregando-se a técnica modificada por Harrison e Vickers (6) pela
20 associação das sondas fluorescentes diacetato de 6-carboxifluoresceína e iodeto de
21 propídio.

22

23 **Análise estatística**

24 A análise estatística das variáveis estudadas no sêmen congelado/descongelado
25 foi realizada mediante o pacote SAS 9.1. Inicialmente, empregou-se o programa R de

1 análise descritiva Box Plot. Em seguida, os dados foram analisados mediante o
2 programa Proc. MIXED, uma análise de variância, para investigar o efeito do
3 tratamento, ou seja, as taxas de congelação e as palhetas utilizadas, considerando o
4 efeito animal como aleatório. Adotou-se um nível de probabilidade de 0,05 para
5 diferenças estatisticamente significativas.

6

7 **RESULTADOS**

8 Na tabela 1 estão demonstrados os valores médios e os erros padrão das
9 variáveis analisadas pós-descongelação pelo sistema computadorizado *CASA* e pela
10 microscopia de epi-fluorescência dos espermatozóides equinos criopreservado.

11 Conforme apresentado na tabela 1, não foram observadas diferenças estatísticas
12 nas avaliações espermáticas pós-descongelação entre os sistemas de congelação ($p >$
13 $0,05$), ou seja, entre a caixa de isopor, máquina TK® 4000 C e a máquina Mini
14 Digitcool® ZH 400. Entretanto, quando comparados os dois tipos de palhetas francesas
15 (0,5mL e 0,25 mL), em todos os sistemas de congelação foram encontradas diferenças
16 estatísticas ($p < 0,05$) nos seguintes parâmetros espermáticos: motilidade total (MT, %),
17 motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP,
18 $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$) e
19 percentagem de espermatozóides rápidos (RAP, %).

20

21 **DISCUSSÃO**

22 No presente estudo foram comparados diferentes protocolos de congelação para
23 o sêmen equino, em dois tipos de palhetas francesas, de 0,5 e de 0,25 mL. Das
24 avaliações espermáticas pós-descongelação não se encontrou diferenças estatísticas
25 entre os sistemas de congelação utilizados, tanto para os parâmetros analisados pelo

1 sistema computadorizado *CASA* como para os parâmetros avaliados pelo microscópio
2 de epi-fluorescência.

3 Entretanto, quando comparados os dois volumes de armazenamento de sêmen,
4 em palhetas de 0,5 e de 0,25 mL observaram-se diferenças estatísticas. Isto demonstra
5 que ocorreu uma alteração da qualidade seminal quando os espermatozóides foram
6 armazenados em diferentes volumes, mesmo com a mesma concentração espermática
7 por palheta. Sendo assim, quanto às características de cinética espermática deduz-se que
8 palheta de 0,5 mL apresenta melhor qualidade seminal que palheta de 0,25 mL.

9 Quanto a qualidade seminal, Nascimento et al. (7) observou que apenas a
10 variável de retilinearidade (STR) apresentou um maior valor médio em palheta de 0,5
11 mL que a de 0,25 mL, enquanto que a velocidade curvilínea (VCL) foi maior em 0,25
12 mL, pelas avaliações pelo sistema computadorizado *CASA*. Todas as demais
13 informações advindas desta tecnologia sugerem uma igualdade na qualidade
14 espermática pós-descongelamento no armazenamento em palhetas de 0,5 e 0,25 mL. Estes
15 resultados divergem totalmente dos resultados obtidos neste estudo, em que ficou claro
16 uma alteração da qualidade seminal entre palhetas de 0,5 e 0,25 mL, mostrando uma
17 inferioridade dos parâmetros espermáticos em palhetas de 0,25 mL. Diferentemente do
18 nosso estudo, em que foi utilizado um período de refrigeração de 20 minutos,
19 Nascimento et al. (7) utilizou um tempo em torno de 80 minutos. Assim, é possível que
20 este tempo de refrigeração maior possa ter acarretado em um resultado disperso dos
21 obtidos neste experimento.

22 Adicionalmente, Dell'Aqua Jr. et al. (5) quando comparou resultados
23 laboratoriais de sêmen equino criopreservado em palhetas de 0,5 e 0,25 mL sugerem
24 valores superiores de cinética espermática quando da utilização de palhetas de 0,25 mL.
25 Tal diferença observada em relação a este experimento, provavelmente, se deve à

1 diferente técnica de congelação, principalmente pela utilização outro meio crioprotetor.
2 No presente estudo foi utilizado um meio crioprotetor do grupo das amidas
3 (dimetilformamida), que por apresentar menor peso molecular e por ser mais permeável
4 ao espermatozóide acarreta a menos injúrias pela maior proteção a célula e talvez mais
5 adaptado ao uso em palhetas de 0,5 mL.

6 Corroborando com os dados obtidos neste estudo, Nothling e Shuttleworth (8)
7 encontraram melhores parâmetros espermáticos de sêmen canino pós-descongelção em
8 palhetas de 0,5 mL que em 0,25 mL. Estes autores utilizaram diferentes taxas de
9 congelção, em dois níveis de distância do vapor de nitrogênio líquido, a 3,5 e a 8,0 cm.
10 Este estudo preconizou um período de refrigeração a 5° C por 20 minutos, similar ao
11 presente experimento.

12 Igualmente ao nosso trabalho, Maxwell et al. (9) observaram que sêmen de
13 carneiro congelado em palheta de 0,5 mL, apresentou motilidade espermática (MT, %)
14 superior em comparação a palhetas de 0,25 mL. Estes autores hipotetizaram que a
15 diferença na área de superfície entre o dois volumes de palhetas resultam em uma menor
16 taxa de congelção para palhetas de maior volume, a qual beneficiaria a sobrevivência
17 dos espermatozóides ovinos. Sendo assim, espermatozóides equinos apresentam uma
18 taxa de congelção menor em palheta de 0,5 mL, por ter uma maior área de superfície
19 entre as células criopreservadas, apresentando um melhor índice de sobrevivência
20 espermática (10).

21 As percentagens de espermatozóides com membrana plasmática íntegras não
22 diferiram entre os protocolos de congelção como também entre os dois volumes de
23 armazenamento utilizados. Sendo assim, os protocolos utilizados não causaram
24 alterações nesta categoria celular. Apesar de a motilidade espermática ter uma
25 correlação positiva com a percentagem de espermatozóides com membrana plasmática

1 íntegra (5), este estudo demonstra que os protocolos afetaram a maioria das variáveis da
2 cinética espermática, mas não integridade da membrana plasmática. Tem-se então, que
3 possivelmente haja outros fatores na estrutura desta célula que interfira na qualidade de
4 seu deslocamento, além das membranas plasmáticas, como por exemplo, a estrutura
5 flagelar.

6 Com relação ao protocolo de congelação utilizado neste experimento, os
7 parâmetros espermáticos nos sistemas automatizados, que possibilitam um melhor
8 controle da taxa de congelação, apresentaram similaridade com os resultados obtidos no
9 método convencional na caixa de isopor. Isto demonstra que, além da praticidade do uso
10 da caixa de isopor, os custos para a realização da congelação neste método são
11 extremamente inferiores, o qual facilita a sua utilização. Associado a isto, observou-se
12 que as taxas de congelação e o uso do diluente a base de amidas, potencializou a
13 eficiência de preservação dos espermatozóides equinos (11).

14 Assim, os resultados deste estudo mostram que as taxas mais rápidas (máquinas)
15 e a mais lenta (caixa de isopor) acarretam a valores similares de qualidade seminal pós-
16 descongelação. Talvez esses valores estejam diretamente relacionados ao tipo de
17 crioprotetor utilizado (Botu-Crio®), como também com a proporção de
18 crioprotetor/espermatozóide. Durante a congelação, os espermatozóides são
19 direcionados para os canais de soluções não congeladas entre os cristais de gelo. Estes
20 canais tornam-se progressivamente mais estreitos com a diminuição da temperatura.
21 Assim, quanto maior a quantidade de moléculas crioprotetoras por célula, maior a
22 percentagem de canais de água não congelada, ocasionando melhor qualidade seminal
23 pós-descongelação (7).

24 Os dados obtidos de motilidade total (MT, %) foram similares aos obtidos por
25 De Vita (12) quando comparou taxas de congelação em sistema automatizado (TK®

1 3000) e em caixa de isopor, utilizando o meio diluente Botu-Crio®. Este autor verificou
2 que metodologias de congelação em taxas mais rápidas, permitiram eficiente taxa de
3 congelabilidade em espermatozóides equinos. Concluindo assim, que a utilização de
4 animais com sêmen de alta congelabilidade e a utilização deste meio diluente permitiu a
5 obtenção de resultados satisfatórios para os parâmetros espermáticos pós-
6 descongelação.

7

8 **CONCLUSÃO**

9 Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que
10 espermatozóides equinos criopreservados em palhetas de 0,5 mL apresentam melhores
11 parâmetros de cinética espermática avaliados pelo sistema automatizado *CASA* do que
12 aqueles armazenados em palhetas de 0,25 mL.

13 Adicionalmente, concluiu-se que sistemas automatizados, os quais possibilitam
14 taxas mais rápidas de congelação, acarretaram a resultados similares de qualidade
15 seminal àqueles criopreservados em sistema convencional de caixa de isopor.

16

17 **REFERÊNCIAS**

18 1. VIANA, JHM, CAMARGO, LSA. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma
19 nova realidade. *Acta Sci Vet.* 2007; 35: 915-19.

20

21 2. AURICH, C. Recents advances in cooled-semen technology. *Anim Reprod Sci.* 2008;
22 107: 268-75.

23

24 3. POLGE, C, SMITH, AU, PARKS, AS. Revival of spermatozoa after vitrification and
25 dehydration at low temperatures. *Nature.* 1949; 15: 164-66.

26

27 4. METCALF, ES. The efficient use of equine cryopreserved semen. *Theriogenology.*
28 2007; 68: 423-28.

- 1 5. DELL'AQUA JR., JA, PAPA, FO, ZAHN, FS. Effects of warming rate on sperm
2 parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen,
3 Anim Reprod Sci. 2001; 68: 344-46.
4
- 5 6. HARRISON, RAP, VICKERS, SE. Use of fluorescent probes to assess membrane
6 integrity in mammalian spermatozoa. J Reprod Fert. 1990; 88: 343-52.
7
- 8 7. NASCIMENTO, J, RAPHAEL, CF, ANDRADE, AFC, ALONSO, MA,
9 CELEGHINI, ECC, ARRUDA, RP. Effects of sperm concentration and straw volume
10 on motion characteristics and plasma, acrossomal and mitochondrial membranes of
11 equine cryopreserved spermatozoa. J Equine Vet Sci. 2008, 28: 351-58.
12
- 13 8. NOTHLING, JO, SHUTTLEWORTH, R. The effect of straw size freezing rate and
14 thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. Theriogenology. 2005, 63: 1469-80.
15
- 16 9. MAXWELL, WMC, LANDERS, AJ, EVANS, G. Survival and Fertility of ram
17 spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. Theriogenology. 1995; 43: 1201-
18 10.
19
- 20 10. STEVENSON, JS, HIGGINS, JJ, JUNG, Y. Pregnancy outcome after insemination
21 of frozen-thawed bovine semen packaged in two straw sizes: A meta-analysis. J Dairy
22 Sci. 2009; 92: 4432-38.
23
- 24 11. TERRACIANO, PB, BUSTAMANTE FILHO, IC, MIQUELITO, LV, ARLAS, TR,
25 CASTRO, F, MATTOS, RC. Criopreservação de espermatozóides equinos comparando
26 duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise
27 laboratorial. Ciência Rural, Santa Maria. 2008; 38 (7), 1972-77.
28
- 29 12. DE VITA, B. Efeito de diferentes sistemas e taxas de congelação na eficiência da
30 congelabilidade e fertilidade do sêmen equino [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de
31 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2008.
32
33

1 **Tabela 1.** Médias com respectivos erros padrão das variáveis analisadas pós-
 2 descongelação de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %),
 3 velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva
 4 (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), percentagem de espermatozoides
 5 rápidos (RAP, %), e integridade de membrana plasmática (IMP, %) nos diferentes
 6 sistemas de congelação e em palhetas francesas de 0,5 e de 0,25 mL.
 7

Parâmetros espermáticos	Caixa de isopor	TK® 4000C	Mini Digitcool®
* Motilidade Total (MT, %)			
0,5mL	67,3 (4,5)	69,9 (4,6)	71,1 (4,6)
0,25mL	60,5 (4,6)	61,9 (4,8)	62,0 (5,1)
* Motilidade Progressiva (MP, %)			
0,5mL	27,8 (3,3)	29,6 (3,4)	30,9 (3,6)
0,25mL	24,3 (3,4)	25,2 (3,4)	24,5 (3,7)
* Espermatozoides rápidos (RAP, %)			
0,5mL	50,4 (6,8)	54,6 (6,9)	55,4 (7,1)
0,25mL	43,9 (6,9)	47,7 (7,1)	45,4 (7,5)
* Velocidade ao longo de trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$)			
0,5 mL	91,9 (4,3)	95,5 (3,1)	96,5 (4,7)
0,25 mL	90,1 (4,3)	93,9 (4,4)	90,3 (4,8)
* Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$)			
0,5 mL	71,3 (3,1)	73,2 (3,0)	75,1 (3,3)
0,25 mL	69,7 (3,1)	72,1 (3,2)	69,5 (3,4)
* Velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$)			
0,5 mL	172,8 (6,1)	177,7 (6,2)	178,0 (6,3)
0,25 mL	168,0 (6,1)	173,7 (6,4)	169,5 (6,9)
Integridade de Membrana Plasmática (IMP, %)			
0,5mL	38,9 (2,6)	38,2 (2,2)	37,8 (2,8)
0,25mL	33,4 (2,4)	37,1 (2,0)	33,4 (2,4)

8 * $p < 0,05$ entre palhetas de 0,5 e 0,25 mL, para os parâmetros de MT, MP, RAP, VAP,
 9 VSL e VCL.

