

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA ADIÇÃO DA ASOLCTINA E FOSFATIDILCOLINA DE SOJA EM
MEIO À BASE DE GEMA DE OVO SOBRE OS PARÂMETROS
ESPERMÁTICOS E FERTILIDADE DE SÊMEN CONGELADO DE
GARANHÕES

ALINE SILVA ROCHA

BOTUCATU-SP

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFEITO DA ADIÇÃO DA ASOLCTINA E FOSFATIDILCOLINA DE SOJA EM
MEIO À BASE DE GEMA DE OVO SOBRE OS PARÂMETROS
ESPERMÁTICOS E FERTILIDADE DE SÊMEN CONGELADO DE
GARANHÕES

ALINE SILVA ROCHA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de Mestre na Área de
Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Tit. Frederico Ozanam
Papa
Co-orientadoras: Dr.^a Cely Marini Melo
Prof.^a Tit. Fernanda
da Cruz Landim

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Rocha, Aline Silva.

Efeito da associação da asolctina e fosfatidilcolina de soja em meio à base de gema de ovo sobre os parâmetros espermáticos e fertilidade de sêmen congelado de garanhões / Aline Silva Rocha. – Botucatu : [s.n.], 2012

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

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Co-orientador: Fernanda da Cruz Landim e Cely Marini Melo

Capes: 50504002

1. Lecitina. 2. Sêmen - Criopreservação. 3. Reprodução animal. 4. Equino – Reprodução. 5. Fecundidade em animais. 6. Equino – Fecundidade.

Palavras-chave: Criopreservação; Garanhão; Lecitina de soja; Sêmen.

Nome do autor: Aline Silva Rocha

Título: EFEITO DA ADIÇÃO DA ASOLCTINA E FOSFATIDILCOLINA DE SOJA EM MEIO À BASE DE GEMA DE OVO SOBRE OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E FERTILIDADE DE SÊMEN CONGELADO DE GARANHÕES

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular Frederico Ozanam Papa
Presidente e orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Adj. Marco Antonio Alvarenga
Membro da banca examinadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Dr. Ian Martin
Membro da banca examinadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Data da Defesa: 19 de julho de 2012

Dedicatória

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a **Deus** e a **minha família**.*

*Aos meus pais, **Domingos** e **Therezinha**, por todos os valores ensinados, pelas lições de vida, pela educação, pelo carinho, por estarem sempre tão presentes em minha vida mesmo apesar da distância, pelo esforço para a realização dos meus sonhos e pelo amor incondicional.*

*À minha irmã, **Luciana**, pelo amor, amizade, carinho e confiança.*

*Aos grandes amigos da família, **Francisco** e **Alice**, que estiveram presentes desde o meu nascimento, tornando cada momento da minha vida mais especial.*

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, **Prof. Tit. Frederico Ozanam Papa** e as minhas co-orientadoras **Fernanda da Cruz Landim** e **Cely Marini Melo** pela oportunidade e por terem aceitado fazer parte deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, **Cezinande Meira, Eunice Oba, João Carlos Pinheiro Ferreira, Marco Antônio Alvarenga, Maria Denise Lopes, Nereu Carlos Prestes e Sony Dimas Bicudo.**

A todos os pós-graduandos do Departamento de Reprodução Animal que me ajudaram na realização deste experimento, em especial: **Fernanda Saules, Gabriel Monteiro, Heloísa Canesin, Ian Martín, Luiz Fernando Novaes, Maria Fernanda Reghini, Priscilla Guasti e Rafael Mide**; às residentes que colaboraram na fase inicial do experimento: **Carolina Moraes, Isabelle Oliveira, Luana Bicudo, Yamê Fabres** e a todos os **estagiários**.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal: **Edilson, Edvaldo, Miguel, Raquel e Válter.**

Aos amigos conquistados em Botucatu: **Bruno (Biro), Elisa Sant'anna, Heron Alves, João Marcelo, João Rafael, Larissa Demoner, Lidiane Narducci, Renata Uliani, Selene Babboni e Leila Ullman.**

À família Vailati: **Maria do Carmo, Jorge e seus filhos, Carol e Zé**, que tive a honra de conhecer e construir uma bela amizade.

À família Volpato: **Rose, Antônio Carlos, Rodrigo, Andressa, Gustavo e Jim**, por todo carinho, amizade e por todos os momentos inesquecíveis que passamos juntos.

À **Universidade Federal Fluminense** pela minha formação acadêmica e a todos os amigos conquistados durante a graduação, em especial: **Ana Carolina Araujo, Camile Carvalho, Carolina Seixas, Bethânia Bastos, Fábio Indá, Felipe Faccini, Liza Gershony, Priscilla Fajardo e Sophia de Carvalho.**

Às amigas do colégio que, mesmo de longe, sempre estiveram presentes me mostrando o valor da verdadeira amizade: **Carla Dias, Elizabeth Bittencourt, Kira Medon, Priscila Gomes e Sabrina Albuquerque.**

A **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudo e por financiar minha vivência em Botucatu.

A **Fundação para Desenvolvimento da UNESP – FUNDUNESP** pelo auxílio financeiro concedido.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos que as grandes proezas da história foram conquistadas daquilo que parecia impossível."

Charles Chaplin

LISTA DE TABELAS

<u>TABELA 1</u> : Valores médios e desvios padrão dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento de sêmen equino congelado com Botu-Crio [®] (BC), Botu-Crio [®] acrescido de asolctina de soja (BC+Ac) e Botu-Crio [®] acrescido de fosfatidilcolina de soja (BC+Fc)	38
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: (a) Representação esquemática da membrana plasmática com seus diferentes componentes; (A) fosfolípideo, (B) proteína transmembrana, (C) região hidrofóbica e (D) região hidrofílica em arranjo assimétrico na bicamada, e (b) as diferentes apresentações em resposta à refrigeração; (b1) fosfolípidos em domínio cristalino, (b2) micela hexagonal II e (b3) proteínas agregadas....12

FIGURA 2: Comportamento biofísico das células em diferentes taxas de refrigeração. Observar os diferentes tamanhos de cristais de gelo nas diferentes taxas de refrigeração. A refrigeração lenta permite a desidratação celular e formação de cristais de gelo apenas no meio extracelular. Na refrigeração rápida não há tempo suficiente para a célula desidratar, deixando-a exposta à formação de grandes cristais intracelulares. A refrigeração muito rápida não permite a desidratação celular e, caso haja formação de cristais de gelo, estes são pequenos e não causam danos.....19

FIGURA 3: Comparação entre os parâmetros de motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), espermatozoides rápidos (RAP; %) e integridade de membrana plasmática (IMP; %) de sêmen equino congelado com Botu-Crio[®] (BC), Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja (BC+Ac) e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja (BC+Fc)39

FIGURA 4: Comparação entre os parâmetros de velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$) e velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$) de sêmen equino congelado com Botu-Crio[®] (BC), Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja (BC+Ac) e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja (BC+Fc).....39

FIGURA 5: Comparação entre os índices de fertilidade de éguas inseminadas com sêmen equino congelado com Botu-Crio[®] (BC), Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja (BC+Ac) e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja (BC+Fc).....40

SUMÁRIO

RESUMO	2
ABSTRACT	4
1 INTRODUÇÃO	6
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 Célula espermática	10
2.2 Membrana plasmática.....	11
2.3 Princípios da criopreservação.....	13
2.4 Injúrias espermáticas resultantes da criopreservação	16
2.5 Meios diluidores e crioprotetores	22
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Experimento I.....	31
4.1.1 Animais e local da pesquisa	31
4.1.2 Preparação dos diluentes	32
4.1.3 Colheita de sêmen.....	32
4.1.4 Análise, processamento e criopreservação do sêmen	32
4.1.5 Descongelamento e análise do sêmen	33
4.1.6 Análise estatística.....	34
4.2 Experimento II.....	35
4.2.1 Animais e local da pesquisa	35
4.2.2 Teste de fertilidade	35
4.2.3 Análise estatística.....	36
6 RESULTADOS.....	38
6.1 Experimento I.....	38
6.2 Experimento II.....	40
7 DISCUSSÃO	42
8 CONCLUSÃO	47
9 BIBLIOGRAFIA	49
TRABALHO CIENTÍFICO	63

Resumo

ROCHA, A.S. **Efeito da adição da asolctina e fosfatidilcolina de soja em meio à base de gema de ovo sobre os parâmetros espermáticos e fertilidade de sêmen congelado de garanhões.** Botucatu, 2012. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição da asolctina de soja ou da fosfatidilcolina de soja em diluente à base de gema de ovo sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade de sêmen congelado de garanhões. No Experimento I, dezenove ejaculados de três garanhões foram submetidos ao processo de criopreservação utilizando três diluentes de congelação: Botu-Crio[®] (BC), Botu-Crio[®] adicionado de asolctina de soja (BC+Ac) e Botu-Crio[®] adicionado de fosfatidilcolina de soja (BC+Fc), para posterior avaliação dos parâmetros de cinética espermática e integridade de membrana plasmática. No Experimento II, comparou-se a taxa de fertilidade referente aos três meios de congelação por meio de inseminação artificial das éguas com “pool” de espermatozoides dos três garanhões. Não houve diferença significativa no que se refere aos parâmetros espermáticos ($P < 0,05$) de motilidade total ($69,16 \pm 9,28$; $64,63 \pm 11,05$; $68,47 \pm 7,92$), motilidade progressiva ($25,00 \pm 5,43$; $23,26 \pm 5,63$; $26,16 \pm 5,50$), integridade de membrana plasmática ($39,37 \pm 8,82$; $39,95 \pm 9,52$; $41,63 \pm 9,24$) e índice de concepção (46,7%, 13,3%, 37,5%) entre os meios BC, BC+Ac e BC+Fc, respectivamente. Entretanto, existiu uma tendência a maior ($P > 0,05$) taxa de fertilidade do diluente Botu-Crio[®] quando comparado ao meio adicionado de asolctina de soja. Diante dos resultados encontrados, conclui-se que tanto a adição da asolctina de soja quanto da fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] apresenta a mesma eficácia que o diluente Botu-Crio[®] convencional na criopreservação de sêmen equino.

Palavras-chave: criopreservação, garanhão, lecitina de soja, sêmen

Abstract

ROCHA, A.S. **Effect of the addition of soybean asolectin and phosphatidylcholine in an egg yolk-based extender on sperm parameters and fertility of frozen stallion semen.** Botucatu, 2012. 77p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of addition of soybean asolectin and phosphatidylcholine in an egg yolk-based extender on sperm parameters and fertility rates of frozen stallion semen. In Experiment I, nineteen ejaculates from three stallions were submitted to cryopreservation process using three freezing extenders: Botu-Crio™ (BC), Botu-Crio™ with soybean asolectin (BC+Ac) and Botu-Crio™ with soybean phosphatidylcholine (BC+Fc), for further evaluation of kinetic parameters and sperm plasma membrane integrity. In Experiment II, the fertility rates from the three freezing extenders were compared through artificial insemination in mares using a sperm “pool” of three stallions. No significant differences were found on sperm parameters ($P < 0.05$) of total motility (69.16 ± 9.28 ; 64.63 ± 11.05 ; 68.47 ± 7.92); progressive motility (25.00 ± 5.43 ; 23.26 ± 5.63 ; 26.16 ± 5.50); plasma membrane integrity (39.37 ± 8.82 ; 39.95 ± 9.52 ; 41.63 ± 9.24) and fertility rates (46.7%, 13.3%, 37.5%), for the BC, BC+Ac and BC+Fc groups, respectively. However, the tendency toward higher ($P > 0.05$) fertility rates in Botu-Crio™ (BC) freezing extender than the freezing extender containing soybean asolectin (BC + Ac). Based in these results, it is concluded that the both addition of soybean asolectin and phosphatidylcholine to Botu-Crio™ freezing extender has the same effectiveness as the conventional Botu-Crio™ used in the cryopreservation of equine semen.

Keywords: cryopreservation, stallion, soybean lecithin, semen

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A equinocultura brasileira destaca-se pelo seu patrimônio genético e seu desempenho no cenário hípico internacional. Acompanhando a evolução deste setor, o desenvolvimento das biotécnicas de reprodução assistida tem despertado um crescente interesse entre criadores, associações e a comunidade científica.

Uma das técnicas mais antigas relacionada à reprodução é a criopreservação de sêmen, que visa manter a integridade estrutural e a viabilidade das células espermáticas após submetê-las a baixas temperaturas e armazená-las a -196°C (CAVALCANTE et al., 2006). Sua descoberta ocorreu casualmente quando Polge et al. (1949) observaram que ao adicionar glicerol ao diluente de congelação, a motilidade dos espermatozoides era preservada após a descongelação do sêmen. O primeiro relato de prenhez com sêmen congelado equino foi descrito por Barker e Gandier (1957), que utilizaram espermatozoides provenientes do epidídimo.

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia de grande impacto na indústria equina, uma vez que permite a maximização do potencial genético do reprodutor, permitindo maior número de descendentes de garanhões de alto valor genético, bem como o armazenamento de material genético de animais que não possam, temporária ou permanentemente, ser utilizados com fins reprodutivos; reduz os custos de transporte e aumenta o controle de doenças sexualmente transmissíveis (SQUIRES et al., 1999).

Apesar das inúmeras vantagens na utilização do sêmen congelado, seu uso tem sido limitado pela redução da fertilidade ocasionada durante o processo de congelação-descongelação do sêmen de alguns garanhões (SQUIRES et al., 2004), havendo diminuição na viabilidade da célula espermática (WATSON, 2000; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009). Os garanhões podem ser classificados como bons congeladores ou maus congeladores, de acordo com as características de motilidade espermática pós-descongelação (HOFFMAN et al., 2011), podendo ocorrer variações não apenas entre diferentes garanhões, mas entre ejaculados de um mesmo reprodutor.

Os fatores que afetam a fertilidade e viabilidade dos espermatozoides incluem o manejo inadequado do botijão de sêmen, falhas no processo de congelação e descongelação e a variação individual na congelabilidade. Os danos causados na estrutura e na funcionalidade da célula espermática durante o processo de criopreservação estão diretamente relacionados às alterações de temperatura, ao estresse tóxico e osmótico pela exposição aos crioprotetores e à formação e dissolução de cristais de gelo (WATSON, 2000).

As crioinjúrias evidenciam-se na perda seletiva de permeabilidade e integridade da membrana plasmática, acrossomal e função mitocondrial (PARKS e LYNCH, 1992), acompanhadas de prejuízo nos parâmetros de vitalidade, motilidade e potencial fertilizante (VIDAMENT et al., 1997; BLOTTNER et al., 2001). Na tentativa de minimizar os danos causados pelo choque térmico, formação de cristais, desidratação celular e estresse tóxico e osmótico e, conseqüentemente, maximizar a sobrevivência do gameta, diversos protocolos de congelação vêm sendo estudados e aprimorados (JASKO, 1994; AMORIM, 2006).

Os diluidores de sêmen são constituídos por substâncias que permitem a preservação da integridade da membrana plasmática mediante a estabilização do pH do meio, a neutralização de produtos tóxicos produzidos pelos espermatozoides, a proteção contra o choque térmico, a manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico, a inibição do crescimento bacteriano e o fornecimento de energia (FURST, 2006). Os aspectos que determinam o sucesso da criopreservação são a toxicidade e o estresse osmótico que as células espermáticas são expostas quando utilizadas altas concentrações de crioprotetores (ALVARENGA et al., 2005), sendo a gema de ovo, o leite e o glicerol os mais comumente encontrados nos meios de congelação.

O leite e a gema de ovo auxiliam na estabilização da membrana plasmática durante os ciclos de congelação e descongelação, prevenindo as injúrias causadas pelo choque térmico (ARIFIANINI e YUSUF, 2010). Entretanto, por questões ligadas ao risco de veiculação de agentes contaminantes, diluidores a base de lecitina de soja tem sido testados para substituir os componentes de origem animal nos meios de congelação de sêmen e para otimizar a qualidade do mesmo.

Os diluentes de congelação compostos por lecitina de soja têm sido incluídos em experimentos realizados com sêmen de diversas espécies e os resultados promissores incentivam ainda mais a busca pela concentração ideal deste componente para minimizar os danos provocados pelo processo de criopreservação (HINSCH et al., 1997; GIL et al., 2003a; RICKER et al., 2006; FELÍCIO et al., 2007; JEYENDRAN et al., 2008; REED et al., 2009; FOROUZANFAR et al., 2010; PAZ et al., 2010; AKHTER et al., 2010; AKHTER et al., 2011; PAPA et al., 2011; KASIMANICKAM et al., 2011; KMENTA et al., 2011).

A busca pela concentração ideal de lecitina de soja para substituição da gema de ovo não é almejada apenas para atingir melhores parâmetros espermáticos e índices de concepção do sêmen equino congelado, mas também, por ser fundamental para facilitar o trânsito de material genético de garanhões de alto potencial sem que haja preocupação com as barreiras sanitárias, evitando o risco de contaminação microbiana e introdução de doenças exóticas na comercialização entre diferentes países. Apesar dos diversos estudos envolvendo diluentes livres de componentes de origem animal, pouco se conhece sobre a associação entre os lipídeos da lecitina de soja e os lipídeos da gema de ovo nos meios de congelação de sêmen equino.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Célula espermática

O espermatozoide é uma célula altamente especializada, cuja característica estrutural é voltada para sua atividade funcional única: asseverar a liberação do material genético presente no núcleo da célula espermática para o oócito, onde ocorre a união dos pronúcleos masculino e feminino, formando o zigoto (EDDY e O'BRYAN, 1994; AURICH, 2005).

Morfologicamente, a célula espermática é constituída por duas estruturas distintas: a cabeça e a cauda, ambas revestidas pela membrana plasmática, também denominada plasmalema (GARNIER e HAFEZ, 2003; COSTA e PAULA, 2003).

A cabeça acomoda o DNA da célula e apresenta como principal função a liberação de uma série haploide de cromossomos para o oócito (MORTIMER et al., 1997). Entre a região anterior do núcleo espermático e a membrana plasmática encontra-se o acrossoma, estrutura de dupla parede que contém enzimas hidrolíticas atuantes no processo de fertilização (GARNIER e HAFEZ, 2003; OLIVEIRA, 2007).

A cauda ou flagelo desempenha a função de promover motilidade ao espermatozoide (SUTOVSKY e MANANDHAR, 2006) possibilitando sua migração pelo trato reprodutivo feminino e, conseqüentemente, sua chegada ao oócito (MORTIMER et al., 1997). É subdividida em quatro segmentos: colo, que conecta a cabeça do espermatozoide à cauda, propriamente dita; peça intermediária, que contém mitocôndrias em seu interior produzindo energia necessária à movimentação espermática; peça principal, que fornece a estabilidade dos elementos contráteis da cauda; e peça terminal, que contém apenas o axonema central recoberto pela membrana plasmática (GARNIER e HAFEZ, 2003; SUTOVSKY e MANANDHAR, 2006; EDDY e O'BRYAN, 1994).

Para que ocorra a fecundação, o espermatozoide deve apresentar pelo menos quatro características pós-descongelção: metabolismo para a produção de energia; motilidade progressiva; enzimas acrossomais intactas, necessárias à penetração do espermatozoide por meio das estruturas que

circundam o oócito; e proteínas de membrana plasmática, fundamentais para a sobrevivência da célula espermática no trato reprodutivo da fêmea e para que ocorra a junção da mesma ao oócito no momento da fecundação (AMMAN e PICKET, 1987; PICKET e AMMAN, 1992).

2.2 Membrana plasmática

A membrana plasmática envolve toda a célula espermática unindo seus componentes intracelulares e organelas e mantendo um gradiente químico de íons e outros componentes solúveis por meio de sua permeabilidade (SILVA e GADELLA, 2006; ALMEIDA, 2006; BRANDÃO, 2008). É heterogênea e consiste de cinco domínios que possuem composição e função distintas: acrossoma, segmento equatorial, segmento basal, domínio da peça intermediária e domínio da cauda (LADHA, 1998; AURICH, 2005; EDDY e O'BRYAN, 1994).

As membranas celulares são formadas por três classes de moléculas: os lipídeos, responsáveis pela integridade estrutural; as proteínas, responsáveis pelos processos dinâmicos (ALMEIDA, 2006); e os carboidratos, que aumentam o caráter hidrofílico e estabilização da estrutura da membrana (DARNELL et al., 1990; ALMEIDA, 2006).

O modelo estrutural básico da membrana plasmática (Figura 1) é composto por lipídeos e proteínas organizados em uma bicamada lipídica contendo moléculas de fosfolipídeos polares, distribuídos assimetricamente e de característica anfipática, ou seja, apresentando uma extremidade hidrofílica, orientada para o meio externo e uma extremidade hidrofóbica, orientada para o meio interno (SQUIRES et al., 1999; ALBERTS et al., 2004; OLIVEIRA, 2007). Este arranjo forma uma barreira hidrofóbica pela qual a água e as moléculas nela dissolvidas passam com dificuldade. As moléculas geralmente atravessam ou são transportadas por meio dos canais ou poros formados pelas proteínas que estão intercaladas aos lipídeos (HOOGEWIJS, 2010).

Os principais constituintes da membrana plasmática do espermatozoide são os fosfolipídeos, os glicolipídeos e os esteroides. Os fosfolipídeos são os mais abundantes, principalmente, fosfatidilcolina, esfingomielina,

fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (PARKS e LYNCH, 1992; FURST, 2006). Os dois primeiros encontram-se dispostos no folheto externo da bicamada lipídica, enquanto os dois últimos, no folheto interno (LADHA, 1998; SILVA e GUERRA, 2011). O colesterol, esteroide predominante, estabiliza a membrana preenchendo os espaços entre as cadeias de ácidos graxos de fosfolípidos (PARKS e GRAHAM, 1992; SQUIRES et al., 1999). A remoção do colesterol da membrana plasmática provoca sua desestabilização e, conseqüentemente, a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo a redistribuição de proteínas integrais (AMMAN e GRAHAM, 1992), aumentando sua capacidade de fusão. Já os glicolípidos localizam-se na superfície da membrana e representam menos de 10% dos lípidos polares (PARKS e LYNCH, 1992; GONZALEZ, 2004).

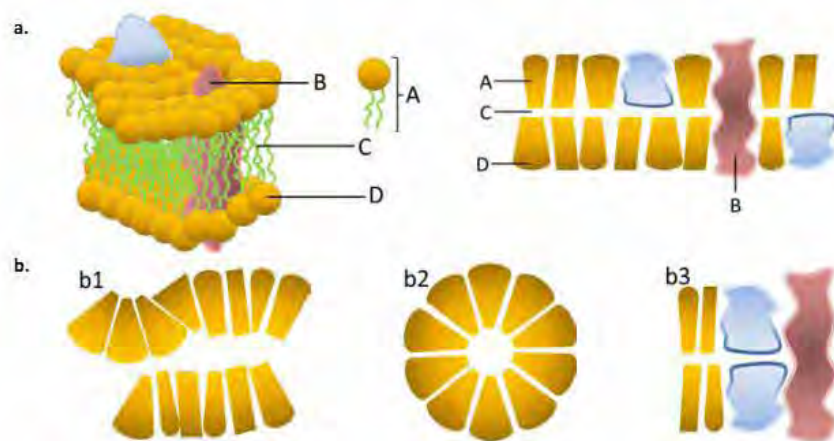


FIGURA 1: (a) Representação esquemática da membrana plasmática com seus diferentes componentes; (A) fosfolípido, (B) proteína transmembrana, (C) região hidrofóbica e (D) região hidrofílica em arranjo assimétrico na bicamada, e (b) as diferentes apresentações em resposta à refrigeração; (b1) fosfolípidos em domínio cristalino, (b2) micela hexagonal II, e (b3) proteínas agregadas.

(Adaptada de HOOGEWIJS, 2010)

O arquétipo mosaico fluido da membrana é essencial ao desempenho adequado de suas funções (HAMMERSTEDT et al., 1990), permitindo extremo dinamismo a esta estrutura. Sob esta forma, as proteínas encontram-se livres para movimentarem-se entre os fosfolípidos bilaterais, garantindo as interações lipídeo-lipídeo e lipídeo-proteína (JASKO et al., 1992). Essas

interações são consideradas a base para ordenar os domínios na membrana plasmática essenciais à funcionalidade espermática, levando a compartimentalização da mesma (PARKS e GRAHAM, 1992).

Os fatores que mais interferem na fluidez da membrana são a temperatura, a natureza dos fosfolipídeos e a composição relativa entre fosfolipídeos e colesterol. Quando se reduz a temperatura, os lipídeos e proteínas de membrana que se encontravam em estado de fluidez possibilitando a livre movimentação dos componentes, passam para o estado gel. Isto ocorre porque as cadeias de ácidos graxos que se apresentavam dispostas desordenadamente organizam-se de forma paralela, constituindo uma estrutura rígida que torna estas áreas fracas, susceptíveis a rupturas, fusões e permeáveis a íons (HAMMERSTEDT et al., 1990; FURST, 2006). A membrana plasmática também tem sua fluidez alterada conforme a quantidade de colesterol, ficando menos flexível na presença de níveis mais elevados (AMANN e PICKET, 1987; AMANN e GRAHAM, 1992).

2.3 Princípios da criopreservação

A criopreservação de sêmen consiste na congelação e armazenamento de espermatozoides à temperatura de -196°C , a fim de manter a integridade estrutural e a viabilidade da célula espermática por tempo indeterminado (AMORIM, 2006; CAVALCANTE et al., 2006; LORENZONI, 2010). Embora esta técnica tenha sido desenvolvida no final do século XVIII, sua difusão só ocorreu em 1949, quando Polge et al. constataram, casualmente, que as células espermáticas apresentavam suas características preservadas mediante congelação em presença de glicerol.

O crescente interesse na utilização da inseminação artificial com sêmen congelado na espécie equina deve-se às diversas vantagens inerentes a esta biotecnologia, tais como: preservação do material genético de reprodutores de alto potencial por tempo ilimitado; utilização do sêmen de garanhões que não mais se encontram aptos à reprodução por doenças ou até mesmo após óbito; redução do risco de acidentes no transporte dos animais para cobertura e de exposição ao estresse e doenças; facilidade na aquisição e transporte do

sêmen entre países, favorecendo a importação e exportação do mesmo (GRAHAM, 1996; SQUIRES et al., 1999; MEDEIROS, 2003).

Apesar das inúmeras vantagens na utilização do sêmen congelado, seu uso tem sido limitado pela redução da fertilidade ocasionada durante o processo de congelação-descongelação do sêmen de determinados gananhões (SQUIRES et al., 2004), comprovada por índices inferiores de prenhez em relação à monta natural e inseminação artificial com sêmen refrigerado. Este prejuízo é decorrente da combinação de dois fatores: perda da viabilidade espermática e danos na capacidade funcional dos espermatozoides sobreviventes (WATSON, 2000; GONZALEZ, 2004). Existem falhas no estabelecimento de padrões de qualidade e controle das doses de sêmen comercializadas, além da enorme variabilidade na qualidade do sêmen pós-descongelação (LEIPOLD et al., 1998; SAMPER, 2001; LOOMIS, 2001; LOOMIS e GRAHAM, 2008; AVANZI et al., 2011). E o que dificulta ainda mais o uso desta biotecnologia, é a necessidade de profissionais qualificados para atuar desde o momento da colheita do sêmen até a criopreservação e sua adequada utilização nos programas de inseminação artificial. Em muitos casos, é preciso deslocar o gananhão até locais onde o procedimento possa ser realizado da maneira adequada, aumentando as despesas (GRAHAM, 1996).

Existe um fator racial e muitas vezes individual relacionado à resistência espermática ao processo de congelação. Entretanto, ainda não estão esclarecidas as causas determinantes destas variações (MEDEIROS, 2003). Ejaculados de um mesmo gananhão e gananhões distintos apresentam diferenças no que se refere à viabilidade espermática pós-congelação (AMMAN e PICKET, 1987; LOOMIS e GRAHAM, 2008).

O principal desafio da célula espermática durante o processo de congelação não é sua habilidade em resistir à temperatura de armazenamento a -196°C , mas sim, sua capacidade de suportar alterações que ocorrem durante as zonas intermediárias de temperatura (19°C a 8°C e -15°C a -60°C) pelas quais ela passa tanto durante a fase de congelação quanto durante a descongelação (MAZUR, 1984; GONZALEZ, 2004).

O protocolo da criopreservação constitui-se em: coleta de sêmen, diluição, centrifugação, resfriamento, desidratação celular, congelação e descongelação do sêmen (MEDEIROS, C. et al., 2002). Deste modo, o

processo de congelação do sêmen equino envolve uma série de processos físicos e químicos que estão diretamente relacionados à manutenção da integridade e viabilidade espermática e à fertilidade (GRAHAM, 1996). As injúrias provocadas aos espermatozoides durante este procedimento podem ser ultraestruturais ou físicas, bioquímicas ou funcionais (ALMEIDA, 2006; GONZALEZ, 2004).

Após a colheita do sêmen, este deve ser diluído em meio adequado e resfriado à temperatura ambiente, em torno de 20°C. A faixa crítica de temperatura ocorre quando o resfriamento chega à 5°C, fase em que o espermatozoide se torna mais susceptível aos danos causados pelo estresse térmico, perdendo motilidade e potencial fertilizante (WATSON, 1995), pois este é o momento em que a membrana plasmática está passando do estado líquido cristalino para o estado gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS, C. et al., 2002). As injúrias causadas pelo choque térmico incluem lesões na membrana espermática, redução do metabolismo de carboidratos e perda de componentes (proteínas, lipídeos, enzimas) (DOBRINSKI et al., 1995). É possível minimizar estes danos por meio do controle da taxa de resfriamento e da adição de crioprotetores ao meio diluente (WATSON, 1995).

O ponto de congelação do citoplasma celular, geralmente, ocorre em temperaturas abaixo de -1°C. Entretanto, mesmo na presença de gelo, as células ainda não se encontram congeladas na faixa entre -10°C e -15°C e sim, super-resfriadas (AMMAN e PICKET, 1987; MEDEIROS, C. et al., 2002). Isto sugere que a membrana plasmática pode prevenir a propagação do gelo extracelular para o interior da célula super-resfriada. Sabendo-se que a pressão de vapor da água super-resfriada é maior que a do gelo, as células começam a se equilibrar por meio da desidratação e se forma uma concentração de eletrólitos no interior da célula. À medida que a solubilidade dos eletrólitos vai sendo ultrapassada, ocorre a precipitação dos solutos alterando o pH e, abaixo do ponto eutético do sistema (temperatura em que não resta nenhum líquido), todos os solutos se precipitam. Estes eventos são denominados efeito solução, representados por: desidratação excessiva; elevada concentração de solutos, solução tóxica à célula; mudança de pH celular alterando o metabolismo da célula (FURST, 2006). O aumento da concentração de soluto ocasiona uma desnaturação proteica e,

consequentemente, diminui a atividade enzimática dos espermatozoides congelados (PICKET, 1986).

O sucesso na criopreservação do sêmen está condicionado à qualidade do sêmen fresco e às interações entre os diluidores, crioprotetores e curvas de congelação-descongelação, a fim de minimizar os danos provocados pelo choque térmico, formação de cristais de gelo, efeito solução e desidratação (PICKET e AMMAN, 1992; JASKO, 1994).

2.4 Injúrias espermáticas resultantes da criopreservação

O processo de criopreservação submete a célula espermática a condições de estresse que acarretam injúrias comprometendo sua viabilidade. Dentre as causas, destacam-se: variações de temperatura e exposição a temperaturas não fisiológicas; estresse tóxico e osmótico pela exposição aos crioprotetores; formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular; danos oxidativos pela alteração na permeabilidade da membrana do espermatozoide (WATSON, 2000).

A membrana plasmática funciona como uma barreira física ao meio externo e é a primeira estrutura a ser afetada pelas crioinjúrias, que incluem a desestabilização da membrana pelo rearranjo lateral dos lipídeos, perda de lipídeos pela membrana e peroxidação lipídica como resultado da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes eventos podem afetar a motilidade espermática, a resposta ao estresse osmótico e as vias de sinalização e, consequentemente, a habilidade de atingir, se ligar e reagir com a zona pelúcida fica comprometida (RICKER et al., 2006).

Uma série de respostas biofísicas ainda não totalmente esclarecida está envolvida no processo de criopreservação das células e tecidos. O índice de sobrevivência espermática ao resfriamento, congelação e aquecimento depende das taxas de resfriamento e aquecimento utilizadas, do tempo em que a célula é mantida em cada etapa, do transporte de substâncias e da formação de cristais de gelo. Sendo que a resposta celular mais importante ao congelamento é atribuída à perda de água e à formação de cristais de gelo intracelular (FURST, 2006).

A lesão celular que ocorre durante o processo de congelação e descongelação do sêmen é causada pela formação de cristais de gelo intracelular que afeta a estrutura da célula espermática, pela concentração de soluto resultante da congelação da água pura e pela interação entre estes dois fatores. As elevadas concentrações de sais no meio durante a congelação podem desidratar os espermatozoides causando deformações celulares, danos à estrutura da membrana, deslocamento e desnaturação das proteínas da membrana e desarranjo de estruturas do citoesqueleto (AMMAN E PICKET, 1987; WATSON, 2000).

Com a diminuição da temperatura, a concentração de soluto no meio extracelular aumenta, a água sai da célula e forma cristais de gelo intracelulares, dependendo da curva de resfriamento (MAZUR, 1984). No resfriamento lento (-25 a -40°C/min), o espermatozoide sofre desidratação devido à elevada concentração de solutos no meio extracelular, causando a migração de elevada quantidade de água para fora da célula, não havendo formação de grandes cristais de gelo intracelular (AMMAN e PICKET, 1987), entretanto, o conseqüente efeito solução pode prejudicar a célula espermática (WATSON, 1995). No caso de uma curva muito rápida de resfriamento (>-60°C/min), a célula não consegue perder água suficientemente rápido para manter o equilíbrio, tornando-se super-resfriada e resultando na congelação intracelular. A extensão dos danos causados pelo gelo no interior da célula depende do grau de formação do gelo e do tamanho dos cristais. Cristais grandes podem causar danos mecânicos às células, sendo uma das principais causas de morte celular durante a congelação, enquanto os pequenos cristais podem não ser deletérios. Todavia, durante o aquecimento, o crescimento desses pequenos cristais em decorrência da recristalização pode causar sérios danos (MAZUR, 1984).

Durante a descongelação do sêmen, a sobrevivência dos espermatozoides depende da resistência em passar novamente pela faixa crítica de temperatura. A curva ideal de aquecimento está diretamente relacionada à curva utilizada na congelação. Se a congelação for lenta, a descongelação também deve ser lenta para que os cristais de gelo extracelulares descongelem, visto que a descongelação desses cristais provoca a diluição dos solutos e promove a reidratação celular lentamente.

Deste modo, evita-se o rompimento da membrana pela rápida reconstituição do volume intracelular ao reidratar a célula. Por outro lado, se o sêmen for descongelado muito rapidamente, os cristais de gelo extracelulares descongelam-se na mesma velocidade e a água do meio invade bruscamente a célula, ocasionando danos à membrana plasmática. Caso o sêmen seja congelado rapidamente, os espermatozoides não sofrem desidratação, logo, quando o gelo extracelular derrete, não há influxo rápido de água por meio da membrana celular. Então, o sêmen congelado rapidamente também deve ser descongelado rapidamente, de modo que o gelo intracelular formado durante a congelação não tenha tempo de recristalizar (Figura 2) (AMMAN e PICKET, 1987; WATSON, 1995).

A congelação rápida aliada à descongelação lenta ocasiona danos pela formação de pequenos cristais de gelo que podem se agrupar formando grandes cristais, que levam à ruptura da membrana (WATSON, 2000). Então, a curva ideal de congelação deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozoides desidratem e rápida o bastante para evitar que os espermatozoides fiquem expostos por muito tempo às elevadas concentrações de soluto (SILVA e GUERRA, 2011).

O choque térmico é um conjunto de alterações que ocorre na célula espermática submetida à refrigeração rápida a partir da temperatura corpórea ($\pm 38^{\circ}\text{C}$) até temperaturas ao redor de 5°C (WATSON, 2000; SILVA e GUERRA, 2011). Provoca danos irreversíveis aos espermatozoides, evidenciados pela rápida queda de motilidade, movimentação circular, redução do metabolismo espermático, aumento da permeabilidade da membrana e perda de moléculas intracelulares e íons (AMMAN e PICKET, 1987; AURICH, 2005). Em temperaturas abaixo de -20°C , os espermatozoides começam a apresentar mudanças biofísicas, especialmente na membrana plasmática e, ao atingirem temperaturas abaixo de -60°C , sofrem efeitos de descompensação iônica e de lipídeos que também provocam choque térmico (ALMEIDA, 2006). Entre os ganhões ou entre ejaculados de um mesmo reprodutor podem ocorrer variações na sensibilidade ao choque térmico, o que pode estar relacionado às diferenças nas concentrações de colesterol contido na membrana plasmática (AURICH, 2005).

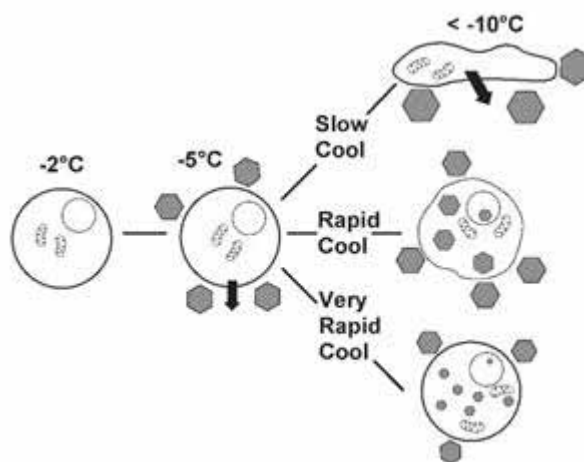


FIGURA 2: Comportamento biofísico das células em diferentes taxas de refrigeração. Observar os diferentes tamanhos de cristais de gelo nas diferentes taxas de refrigeração. A refrigeração lenta permite a desidratação celular e formação de cristais de gelo apenas no meio extracelular. Na refrigeração rápida não há tempo suficiente para a célula desidratar, deixando-a exposta à formação de grandes cristais intracelulares. A refrigeração muito rápida não permite a desidratação celular e, caso haja formação de cristais de gelo, estes são pequenos e não causam danos.

(Adaptado de CRITSER e BENSON, 2003)

A velocidade da redução de temperatura durante a congelação do sêmen é uma das etapas mais importantes deste processo, pois variações inadequadas na curva de resfriamento aumentam o grau de desafio enfrentado pelos espermatozoides (TERRACIANO et al., 2008). Terraciano et al. (2008) constataram que o sistema automatizado de congelação foi mais eficiente que o sistema não automatizado na criopreservação de sêmen equino, uma vez que preservou de maneira mais competente a motilidade total e progressiva, a integridade e a funcionalidade dos espermatozoides. Estes resultados foram atribuídos à maior precisão no controle do decréscimo da temperatura obtido pelo sistema automatizado de congelação.

Os crioprotetores são essenciais à sobrevivência dos espermatozoides durante o processo de congelação, contudo, eles podem exercer efeitos tóxicos e reduzir os índices de fertilidade quando presentes em concentrações elevadas (WATSON, 2000). Os efeitos decorrentes da toxicidade incluem o aumento da permeabilidade e indução da fusão da membrana plasmática; inibição da atividade enzimática (FAHY, 1996), resultando na desnaturação de

proteínas (ALVARENGA et al., 2005) e alterações das interações de actina (FAHY et al., 1990); estresse osmótico (LORENZONI, 2010). O glicerol, crioprotetor amplamente utilizado na espécie equina, induz a mudanças nos eventos citoplasmáticos por aumentar a viscosidade ao penetrar a célula espermática; provoca alterações na polimerização da tubulina e na associação dos microtúbulos; afeta o balanço bioenergético, além de atuar de maneira direta e prejudicial na membrana plasmática, no glicocálix e nas proteínas de superfície celular (HAMMSTEREDT e GRAHAM, 1992).

A maioria dos agentes crioprotetores apresenta permeabilidade inferior à da água, levando a um influxo de água que acarreta aumento do volume celular (BALL e VO, 2001). A exposição das células a uma solução hiperosmótica é responsável pela remoção da água intracelular e, conseqüentemente, ocorre o encolhimento da célula e influxo de íons. Entretanto, a descongelação ocasiona o contrário: há influxo de água que pode resultar em ruptura de membrana (HOLT, 2000).

O limite de tolerância osmótica (OTL) que a célula espermática suporta, isto é, o quanto a célula pode encolher ou expandir de acordo com as mudanças de osmolaridade, varia entre as espécies. É possível utilizar o OTL como limiar para determinar a quantidade e o tempo requerido para adição e remoção de crioprotetor, mantendo as células dentro de sua margem de tolerância de volume (GONZALEZ, 2004). O espermatozoide dos mamíferos funciona como um osmômetro linear, havendo morte celular em caso de entumescimento ou encolhimento quando submetido a níveis superiores de tolerância espécie-específica (BALL e VO, 2001).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são agentes altamente reativos pertencentes à classe dos radicais livres (AITKEN e FISHER, 1994). Desempenham importante papel na função espermática, entretanto, sua produção desequilibrada ou sua degradação podem causar efeitos adversos nos espermatozoides (BALL, 2008). Em elevadas concentrações, as ROS prejudicam a motilidade, a viabilidade e a função espermática por meio da interação com lipídeos da membrana, proteínas, DNA mitocondrial e nuclear (PEIXOTO et al., 2008).

O estresse oxidativo no sêmen resulta de um desequilíbrio entre produção de ROS e sua capacidade antioxidante. Os efeitos tóxicos do

oxigênio são resultantes da oxidação de componentes celulares como tióis, cofatores enzimáticos, proteínas, nucleotídeos e lipídeos, principalmente, ácidos graxos poli-insaturados, mediada por ROS e espécies reativas de nitrogênio (SILVA e GUERRA, 2011). A reação destas espécies com os ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas desencadeia o processo de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação, que pode ser avaliado e utilizado como indicador do estresse oxidativo celular (WILLIAMS e FORD, 2005).

Os espermatozoides são muito susceptíveis a esse tipo de estresse em razão da grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados existentes em sua membrana (ALVAREZ e STOREY, 1992) e, diferentemente da maioria das células, a célula espermática perde a maior parte de seu citoplasma durante o período de maturação, sendo privada de uma fração dos antioxidantes endógenos, o que a torna mais vulnerável à ação das ROS (CARVALHO et al., 2002). A presença de ROS é consideravelmente maior na presença de espermatozoides morfológicamente anormais ou que sofreram crioinjúrias, apresentando, principalmente, gota citoplasmática proximal ou anormalidades na peça intermediária. A proteção conferida pelos antioxidantes presentes no plasma seminal é a mais importante forma de proteção contra as ROS (BALL, 2008; SILVA e GUERRA, 2011).

Danos causados nos espermatozoides durante a congelação têm sido associados à criocapacitação, definida por alterações que ocorrem nos espermatozoides semelhantes as que acontecem durante o processo de capacitação espermática. O aumento da produção de ROS, a reduzida capacidade antioxidante do espermatozoide e a desorganização da membrana decorrente dos processos de congelação e descongelação provocam aumento da permeabilidade da mesma, resultando na penetração dos íons cálcio que estavam no meio extracelular estimulando, assim, os eventos dependentes de cálcio, como a capacitação espermática (WATSON, 2000).

A partir do momento em que ocorre a capacitação espermática prematura, o espermatozoide apresenta longevidade mais curta, não é mais possível que ele realize a fecundação e, conseqüentemente, há redução da fertilidade (OLIVEIRA, 2007).

2.5 Meios diluidores e crioprotetores

Os diluidores utilizados na criopreservação de sêmen desempenham as funções de manutenção da atividade metabólica dos espermatozoides; estabilização da membrana plasmática mediante o equilíbrio do pH do meio (efeito tampão); neutralização de produtos tóxicos provenientes dos espermatozoides; proteção contra o choque térmico; manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico; inibição do crescimento bacteriano; fornecimento de energia (FURST, 2006; LORENZONI, 2010). Para isso, são compostos basicamente por substâncias iônicas e não iônicas; fonte de lipoproteínas ou substâncias de alto peso molecular, tais como: leite, gema de ovo ou lecitina de soja; glucose ou frutose como fonte de energia; crioprotetores; outros aditivos, como enzimas e antibióticos (VISHWANATH e SHANNON, 2000; AIRES et al. 2003).

Os crioprotetores são substâncias que se ligam à água alterando seu ponto de fusão e interferindo no ponto de cristalização. Removem os núcleos de cristalização e diminuem a faixa crítica de temperatura na qual se formam os cristais responsáveis pela crioinjúria (AMORIM, 2006). Para que exerçam um efeito eficiente, o ideal é que os crioprotetores possuam baixo peso molecular, alta solubilidade em água e mínima toxicidade (MEDEIROS, A. et al., 2002; ALVARENGA et al., 2005). Podem ser classificados em extracelulares (não penetrantes) ou intracelulares (penetrantes).

O crioprotetor penetrante mais utilizado é o glicerol, embora já tenha sido relatado que o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido (DMSO) e as amidas podem alcançar resultados similares ou até mesmo superiores (MEDEIROS, A. et al., 2002; SQUIRES et al., 2004; ALVARENGA et al., 2005). Os agentes crioprotetores penetrantes exercem ação baseada em suas propriedades coligativas ou propriedades de ligação com a molécula da água, modificando as características desta molécula durante o processo de congelação, limitando a formação de cristais de gelo, retardando o crescimento de cristais e reduzindo as concentrações de soluto nos meios extracelular e intracelular (DALIMATA e GRAHAM, 1997). Estes agentes se ligam à molécula de água por pontes de hidrogênio, alterando a orientação dos cristais de gelo e,

consequentemente, criando um ambiente menos nocivo à célula espermática (AMMAN e PICKET, 1987; DALIMATA e GRAHAM, 1997). Ainda, as ligações de hidrogênio à molécula de água promovem uma estabilização da conformação das proteínas quaternárias da membrana, preservando-a da desidratação (MEDEIROS, 2003).

Os agentes crioprotetores não penetrantes são representados por moléculas de alto peso molecular, como açúcares, lipoproteínas da gema de ovo ou lecitina de soja, proteínas do leite e alguns aminoácidos (AMMAN e PICKET, 1987; AIRES et al., 2003). Aumentam a osmolaridade do meio extracelular, ou seja, tornam o ambiente hipertônico promovendo a desidratação pela saída de água do interior da célula espermática e reduzindo, assim, a formação de cristais de gelo intracelular durante a congelação (AMMAN e PICKET, 1987; GONZALEZ, 2004).

A gema de ovo é frequentemente utilizada em protocolos de criopreservação de sêmen de diversas espécies conferindo proteção extracelular ao espermatozoide. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema de ovo, particularmente os fosfolípidos, são componentes efetivos na preservação e proteção dos espermatozoides contra o choque térmico. Possivelmente, esta proteção ocorre pela adesão das lipoproteínas de baixa densidade à membrana celular durante o processo de criopreservação, ocupando sítios específicos que tornam a membrana mais resistente (MOUSSA et al., 2002), além de restaurar a perda de fosfolípidos, induzindo a uma alteração transitória da composição da membrana plasmática e, consequentemente, prevenindo a sua ruptura (FARSTARD, 1996).

Os fosfolípidos provenientes da gema de ovo também evitam o aumento do cálcio (Ca^{++}) intracelular durante a refrigeração do sêmen, prevenindo a disfunção e morte celular. Para tentar minimizar os danos causados pelo Ca^{++} no ciclo de congelação, pode-se utilizar o etileno diaminotetraacetato dissódico (EDTA) nos meios diluidores com o intuito de quelar o cálcio no meio extracelular, reduzindo seu influxo para o interior da célula (WATSON, 1981; AMMAN e PICKET, 1987; JASKO et al., 1992).

As proteínas do leite atuam na criopreservação de sêmen como tampão e apresentam propriedade quelante diante de metais pesados, contribuindo para a diminuição dos efeitos provocados pelo choque térmico (SALAMON e

MAXWELL, 2000). Melo et al. (2005) sugeriram que os diluentes à base de gema de ovo apresentam maior capacidade de preservar a membrana plasmática dos espermatozoides do que os meios à base de leite desnatado.

Problemas relacionados ao uso de produtos de origem animal nos meios de diluição, tais como risco de contaminação microbiana e a diferença existente entre os lotes motivaram a realização de pesquisas para substituir a gema de ovo e/ou o leite pela lecitina de soja em diluentes para criopreservação de sêmen (AURICH et al., 2007; ARIFANTINI e YUSUF, 2010). Sugere-se que a lecitina de soja e a gema de ovo protejam os fosfolipídeos da membrana espermática e aumentem a tolerância à congelação (WATSON, 1981; FOROUZANFAR et al., 2010).

Os lipídeos da lecitina de soja, assim como os da gema de ovo presentes nos crioprotetores, se associam fortemente à superfície da membrana plasmática proporcionando uma barreira física aos danos causados pelo processo de congelação-descongelação pela adesão à superfície da membrana plasmática (RICKER et al., 2006).

A lecitina (ou fosfatidilcolina) desempenha um importante papel na regulação da função fisiológica das membranas celulares nos animais (ZHANG et al., 2009). Cerca de 10% dos lipídeos provenientes da soja são representados pela lecitina, a qual acredita-se ser o componente ativo das lipoproteínas de baixa densidade da gema de ovo, conferindo proteção à célula espermática contra o choque térmico e aumentando a tolerância à criopreservação (THUN et al., 2002; AIRES et al., 2003; JEYENDRAN et al., 2008). Existem autores que sugerem que a lecitina de soja efetua uma proteção mais eficiente ao espermatozoide do que a gema de ovo (DELLAQUA JR. et al., 2007; ZHANG et al., 2009; KMENTA et al., 2011; ROOF et al. 2012).

Papa et al. (2011) testaram a substituição da gema de ovo pela lecitina de soja utilizando como diluente base o Botu-Crio[®]. Foram avaliadas diversas concentrações de lecitina de soja e os resultados referentes aos parâmetros espermáticos foram similares ao diluente convencional Botu-Crio[®], confirmando o efeito protetor da lecitina de soja sobre os espermatozoides criopreservados. Por outro lado, neste mesmo trabalho observou-se que as taxas de fertilidade foram inferiores nos meios compostos por lecitina de soja, provavelmente, por uma forte interação dos lipídeos da lecitina de soja com a membrana

plasmática dos espermatozoides criopreservados, prejudicando o processo de capacitação e, conseqüentemente, a fecundação.

Em pesquisa realizada por Ricker et al. (2006), foi avaliado o efeito da substituição da gema de ovo no meio de congelação de sêmen equino INRA82[®] pela fosfatidilcolina de soja e pela fosfatidilcolina de ovo. Não houve diferença significativa entre os meios testados quanto aos parâmetros de motilidade espermática e integridade de membrana. Ainda, realizaram um estudo preliminar de fertilidade destes meios e também não verificaram desigualdade entre os meios INRA82[®] com fosfatidilcolina de soja e INRA82[®] com fosfatidilcolina de ovo. Em relação aos parâmetros espermáticos, o mesmo foi observado por Felício et al. (2007), que compararam a eficácia de um diluidor de sêmen equino livre de componentes de origem animal (Botu-Crio Egg Free[®]), a base de lecitina de soja, com um diluente convencional a base de gema de ovo.

Além da espécie equina, diversas outras espécies tem sido alvo de estudos para avaliar a criopreservação de sêmen com meios a base de lecitina de soja, dentre as quais: bovina (HISNSCH et al., 1997; AIRES et al., 2003; DELL'AQUA JR. et al., 2007; CELEGHINI et al., 2008; FELIPE-SILVA et al., 2011), ovina (GIL et al., 2003a; GIL et al., 2003b; FOROUZANFAR et al., 2010; DEL VALLE et al., 2011), caprina (BITTENCOURT et al., 2008), bubalina (AKHTER et al., 2010), canina (KMENTA et al., 2011), suína (ZHANG et al., 2009) e humana (JEYENDRAN et al., 2008; REED et al., 2009), tendo alcançado resultados satisfatórios.

Dell'Aqua Jr. et al. (2007) testaram a viabilidade espermática pós-descongelação utilizando os diluidores Tris-gema de ovo e Botu-Bov Egg Free[®] na criopreservação do sêmen bovino. O meio livre de gema de ovo apresentou valores superiores ao Tris-gema de ovo na cinética espermática, sendo considerado uma alternativa para a congelação de sêmen nesta espécie. Também em 2007, o mesmo foi alcançado por Freitas et al., ao compararem a viabilidade espermática utilizando os meios anteriormente descritos em *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. Em caprinos, Roof et al. (2012) compararam o diluente Bioexcell[®] com um a base de gema de ovo (Irvine TYB) na criopreservação de sêmen. O meio composto por lecitina de soja promoveu

motilidade total e progressiva significativamente maior que o meio comercial à base de gema de ovo.

Em estudo realizado por Zhang et al. (2009), comparou-se o diluente à base de lecitina de soja em diferentes concentrações (3, 6, 9 e 12%) com diluente contendo 20% de gema de ovo. A concentração de 6% de lecitina de soja no meio de congelação obteve resultados superiores à gema de ovo e às concentrações maiores de lecitina de soja, nas características de motilidade espermática, integridade de membrana plasmática e integridade de acrossoma em sêmen de javali criopreservado. Akhter et al. (2011), também avaliaram diferentes concentrações de lecitina de soja (5%, 10% e 15%) em meio de congelação de sêmen de búfalo e concluíram que 10% de lecitina de soja no diluente melhora a motilidade, a integridade de membrana, a viabilidade e a fertilidade do espermatozoide comparado à 20% de gema de ovo e demais concentrações testadas de lecitina de soja.

Hinsch et al. (1997) confrontaram o desempenho de um diluente a base de gema de ovo (Triladyl[®]) e um meio a base de lecitina de soja (Biociphos[®]) para criopreservação de sêmen bovino. Foram avaliados os parâmetros de motilidade, viabilidade celular, integridade acrossomal e fertilidade. Os pesquisadores não encontraram discrepância significativa entre os meios, levando a conclusão de que ambos os diluentes possuem qualidade equivalente para criopreservação de sêmen bovino. Aires et al. (2003) não encontraram diferenças entre os meios a base de lecitina de soja (AndroMed[®]) e a base de gema de ovo (Tris-gema) quanto as avaliações *in vitro* do número de espermatozoides ligados à zona pelúcida e capacidade de indução da reação acrossomal. Entretanto, a motilidade espermática pós-descongelação foi consideravelmente inferior no sêmen congelado com meio Tris-gema e a taxa de não retorno ao cio foi significativamente maior no meio AndroMed[®].

Na espécie ovina existem diversas publicações relatando a eficiência do uso da lecitina de soja na criopreservação de sêmen. Fukui et al. (2008) consideraram viável a substituição de meios compostos por gema de ovo por meios a base de lecitina de soja para criopreservação de sêmen de carneiros ao verificarem similaridade entre os diluentes testados no que se refere a taxa de fertilidade. Gil et al. (2003b) chegaram a mesma conclusão ao compararem

a fertilidade do sêmen de carneiro congelado com um diluente convencional a base de leite e gema de ovo ao diluente a base de lecitina de soja, Bioexcell[®].

Nem todos os pesquisadores obtiveram sucesso utilizando a lecitina de soja em meios de congelação de sêmen. Celeghini et al. (2008) verificaram que o diluente Botu-Bov[®] foi mais eficaz na manutenção da motilidade espermática e integridade de membrana que o diluente Bioexcell[®] no sêmen bovino congelado. Ao avaliarem a eficiência do meio Tris-gema de ovo sob dois protocolos de congelação e do meio Biociphos-Plus[®] utilizando apenas um dos protocolos para criopreservação de sêmen bovino, Thun et al. (2002) verificaram divergências entre os meios testados, havendo superioridade do diluente Tris-gema de ovo na análise laboratorial e similaridade no teste de fertilidade.

Em 2008, Bittencourt et al. realizaram um experimento no qual um dos objetivos era avaliar a utilização do diluente Bioexcell[®] na criopreservação do sêmen caprino. Este diluente apresentou o menor percentual de motilidade total e progressiva após a descongelação quando comparado aos diluentes à base de Tris-gema de ovo.

Apesar de serem essenciais à sobrevivência dos espermatozoides criopreservados, os crioprotetores podem provocar toxicidade em concentrações elevadas levando a lesões celulares, danos osmóticos e prejudicando as interações entre o espermatozoide e o trato reprodutivo da fêmea, resultando em diminuição de fertilidade (GRAHAM, 1996; WATSON, 2000).

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Por meio deste estudo, objetivou-se verificar o efeito da adição da asolctina de soja ou da fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®], na congelabilidade e fertilidade do sêmen criopreservado de garanhões.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da adição da asolctina de soja ao diluente Botu-Crio[®] e da fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] sobre os parâmetros espermáticos do sêmen criopreservado de garanhões;
- Verificar se a associação dos lipídeos da asolctina de soja ou da fosfatidilcolina de soja aos lipídeos da gema de ovo presentes no diluente Botu-Crio[®] confere maior proteção à membrana plasmática do espermatozoide equino criopreservado;
- Avaliar os índices de fertilidade do sêmen criopreservado de garanhões com diluente Botu-Crio[®], Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos 2 experimentos complementares de acordo com os objetivos anteriormente propostos. No Experimento I, foi verificado o efeito da adição da asolctina de soja¹ ou da fosfatidilcolina de soja² ao diluente Botu-Crio[®] sobre os parâmetros espermáticos e integridade de membrana plasmática do sêmen equino congelado. No Experimento II, foram avaliados os índices de fertilidade do sêmen equino criopreservado com Botu-Crio[®], Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja.

4.1 Experimento I: Efeito da adição da asolctina de soja ou da fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] sobre os parâmetros espermáticos e integridade de membrana do sêmen equino congelado.

4.1.1 Animais e local da pesquisa

Para as atividades referentes ao Experimento I, foram utilizados três garanhões das raças Puro Sangue Inglês, Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, com idade de 8, 12 e 22 anos, respectivamente, submetidos a regime regular de colheita de sêmen. A motilidade progressiva espermática pós-congelação dos três garanhões era inferior a 30%. Os animais eram pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, SP.

A colheita do sêmen, análise laboratorial, processamento, congelação e estocagem das amostras foram conduzidos no CERAN (Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal) pertencente ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, SP.

¹ Sigma 11145 (Asolctina obtida de soja)

² Sigma P5638 (L- α -Phosphatidylcholine from soybean, Type II-S)

4.1.2 Preparação dos diluentes

Os dois diluentes de congelação foram preparados utilizando como base os componentes presentes no Botu-Crio[®]. Para isso, foi adicionado OEP (orvus-Es paste) à água e esta solução foi separada em 2 amostras: uma recebeu adição de asolctina de soja na concentração de 10g/L e outra, de fosfatidilcolina de soja na concentração de 10g/L. Depois do acréscimo dos lipídeos da soja, as amostras foram homogeneizadas, foi adicionado gema de ovo na concentração de 10% e a solução base “*powder*” presente no Botu-Crio[®], sendo cada amostra novamente homogeneizada. Em seguida, foram levadas à centrífuga refrigerada (Cientec, CT-6000 R) à 5°C por 99 minutos, foi retirado o sobrenadante, realizada a correção do pH e da osmolaridade, adicionado o crioprotetor e realizado o armazenamento à -20°C em frascos contendo 100mL.

4.1.3 Colheita de sêmen

Previamente a colheita dos 19 ejaculados, foi realizada a higienização do pênis dos garanhões com água corrente para a remoção das sujidades. O sêmen foi colhido com a utilização de vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma Botucatu/ME Ltda., SP, Brasil), com temperatura entre 40°C e 42°C, em manequim inanimado.

4.1.4 Análise, processamento e criopreservação do sêmen

Após a colheita, o sêmen foi imediatamente filtrado para remoção da fração gel e de sujidades. A concentração espermática foi avaliada com auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico de contraste de fase sob aumento de 200x, utilizando o fator de diluição de 1 parte de sêmen para 19 partes de água destilada. O número de espermatozoides contados foi multiplicado por 1000 e expresso em número de espermatozoides por milímetro cúbico (mm³).

Os parâmetros de cinética espermática foram avaliados por análise computadorizada dos movimentos espermáticos - CASA (HTM-IVOS 12; Hamilton-Thorne Research, Danvers, MA, USA), depositando-se 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 foram avaliadas, no mínimo, 500 células.

Para a criopreservação do ejaculado, foi empregada a técnica descrita por Papa et al. (2008). O sêmen foi diluído em meio diluente à base de leite desnatado e glicose (Botu-Sêmen[®], Botupharma Botucatu/ME Ltda., SP, Brasil) em uma proporção de 1:1 (meio:sêmen) e, posteriormente, dividido em três alíquotas que foram centrifugadas a 600xg por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os *pellets* ressuspensos para a concentração de 200x10⁶ de espermatozoides viáveis/mL, sendo uma amostra com meio diluente de congelação Botu-Crio[®] (Botupharma Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil), uma amostra com Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja e outra com Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja.

As amostras de cada protocolo foram envasadas em palhetas francesas de 0,5mL previamente identificadas com o nome do ganhão, partida da colheita do ejaculado e protocolo de congelação. Depois de lacradas com álcool polivinílico, as palhetas foram distribuídas em uma grade e refrigeradas a 5°C durante 20 minutos em geladeira Minitub[®] (Minitub do Brasil Ltda), na taxa de 0,5°C/minuto e, decorrido este período, foram destinadas a congelação na máquina automatizada TK[®] 4000C (TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Minas Gerais, Brasil) na velocidade de 15°C/minuto entre 5°C e -10°C e velocidade de 40°C/minuto entre -10°C e -140°C (MAZIERO et al., 2012). Em seguida, foram imersas em nitrogênio líquido e estocadas em botijão.

4.1.5 Descongelação e análise do sêmen

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 46°C por 20 segundos, seguindo a técnica descrita por Dell'Aqua Jr. et al. (2001). A análise de cinética espermática das amostras foi realizada por meio do método

computadorizado, considerando as seguintes variáveis: motilidade total (MT, %), representada pela soma de todas as células móveis; motilidade progressiva (MP, %) - porcentagem de células que apresentam movimento progressivo; velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$) - velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; velocidade linear progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) - velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) - velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula espermática; e espermatozoides rápidos (RAP; %).

A Integridade da Membrana Plasmática (IMP, %) foi analisada pela combinação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína, permeável às células com membrana íntegra, e iodeto de propídio, permeável às células com membrana lesada, de acordo com a técnica descrita por Harrison e Vickers (1990). As amostras foram analisadas entre lâmina e lamínula em microscópio de epifluorescência sob aumento de 400x. Foram contadas 100 células espermáticas, sendo consideradas íntegras as células emitindo fluorescência verde e, lesadas, as com fluorescência vermelho ou verde e vermelho. O resultado foi expresso em porcentagem de células íntegras.

4.1.6 Análise estatística

As médias de cada variável resposta entre os grupos testados foram comparadas pela análise de variância (LITTELL et al., 2006; PROC MIXED, SAS Institute, 2009). O teste de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY, SAS Institute, 2009) foi utilizado para comparar a porcentagem média de espermatozoides rápidos entre os grupos testados devido à distribuição assimétrica.

4.2 Experimento II: Avaliação dos índices de fertilidade do sêmen equino criopreservado com Botu-Crio[®], Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja.

4.2.1 Animais e local da pesquisa

Na segunda etapa experimental, foram utilizadas 19 éguas pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, SP.

O teste de fertilidade foi realizado no CERBEQ (Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina), Campus do Lageado – FMVZ–UNESP – Botucatu - SP.

4.2.2 Teste de fertilidade

As éguas foram monitoradas diariamente por palpação retal e ultrassonografia. Quando detectado folículo com diâmetro médio de 35mm, foi administrado 1mg de acetato de deslorelina por via intramuscular como indutor da ovulação.

Decorridas 33 horas após a indução da ovulação, as éguas foram monitoradas a cada 6 horas até a constatação da ovulação e foram inseminadas uma única vez, até 6 horas após a ovulação, de acordo com os grupos a serem testados, totalizando 46 inseminações. Destas, 15 inseminações foram com Botu-Crio[®], 15 com Botu-Crio[®] associado à asolctina de soja e 16 com Botu-Crio[®] associado à fosfatidilcolina de soja.

Na tentativa de excluir possíveis efeitos individuais relacionados aos garanhões utilizados no experimento, optou-se pela inseminação artificial com “pool” de espermatozoides dos três garanhões, evitando-se a influência do reprodutor sobre os índices de fertilidade.

Para a inseminação, foram descongeladas a 46°C por 20 segundos, duas palhetas de cada garanhão, totalizando 600x10⁶ de espermatozoides viáveis pré-congelação. Estes foram depositados na extremidade do corno uterino ipsilateral à ovulação através do desvio por manipulação retal da pipeta flexível (Minitub do Brasil Ltda).

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

4.2.3 Análise estatística

O teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (PROC FREQ, SAS Institute, 2009) foi usado para comparar a proporção de éguas prenhes por grupo. O nível de significância estatística foi definido em 0,05.

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Experimento I: Efeito da adição da asolctina de soja ou da fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] sobre os parâmetros espermáticos e integridade de membrana do sêmen equino congelado.

Os resultados encontrados para cada uma das variáveis do movimento espermático e integridade de membrana de acordo com o meio de diluição utilizado estão demonstrados na Tabela 1 e nas Figuras 3 e 4.

TABELA 1: Valores médios e desvios padrão dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento de sêmen equino congelado com Botu-Crio[®] (BC), Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja (BC+Ac) e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja (BC+Fc).

Variáveis	BC	BC + Ac	BC + Fc
MT (%)	69,16 ± 9,28	64,63 ± 11,05	68,47 ± 7,92
MP (%)	25,00 ± 5,43	23,26 ± 5,63	26,16 ± 5,50
VAP (µm/s)	100,89 ± 14,72	102,47 ± 13,09	101,26 ± 13,78
VSL (µm/s)	75,16 ± 8,47	76,21 ± 8,07	76,00 ± 8,80
VCL (µm/s)	182,74 ± 22,18	186,11 ± 19,52	182,95 ± 21,32
RAP (%)	53,16 ± 12,77	50,00 ± 14,29	53,16 ± 13,28
IMP (%)	39,37 ± 8,82	39,95 ± 9,52	41,63 ± 9,24

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VAP: velocidade de trajeto, VSL: velocidade linear progressiva, VCL: velocidade curvilínea, RAP: espermatozoides rápidos, IMP: integridade de membrana plasmática.

Não foram observados efeitos significativos ($P > 0,05$) entre os meios Botu-Crio[®], Botu-Crio[®] adicionado de asolctina de soja e Botu-Crio[®] adicionado de fosfatidilcolina de soja sobre as variáveis de motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, µm/s); velocidade

linear progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$); velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$); e espermatozoides rápidos (RAP; %). O mesmo foi verificado em relação à integridade de membrana plasmática, a qual também não diferiu significativamente ($P>0,05$) entre os meios diluentes testados.

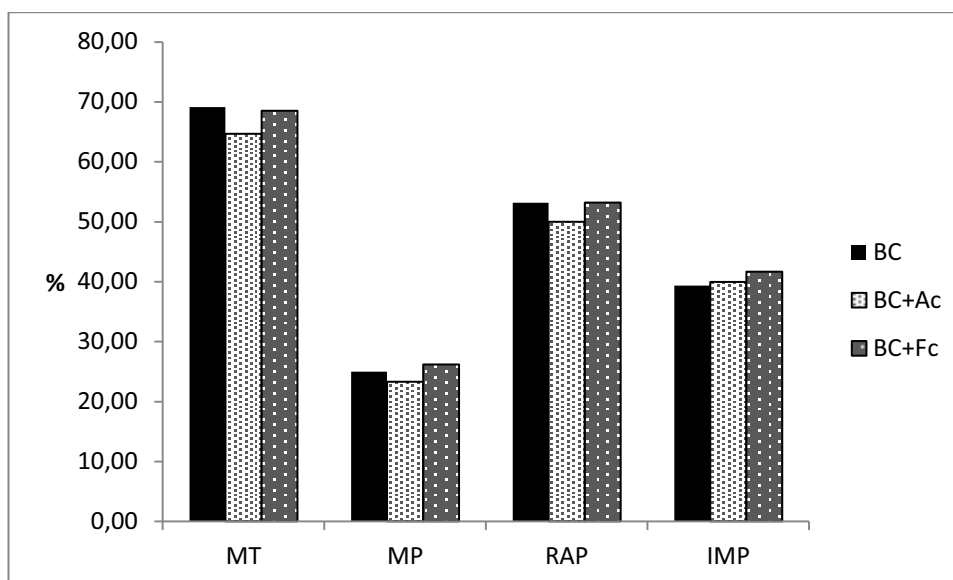


FIGURA 3: Comparação entre os parâmetros de motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), espermatozoides rápidos (RAP; %) e integridade de membrana plasmática (IMP; %) de sêmen equino congelado com Botu-Crio® (BC), Botu-Crio® acrescido de asolctina de soja (BC+Ac) e Botu-Crio® acrescido de fosfatidilcolina de soja (BC+Fc).

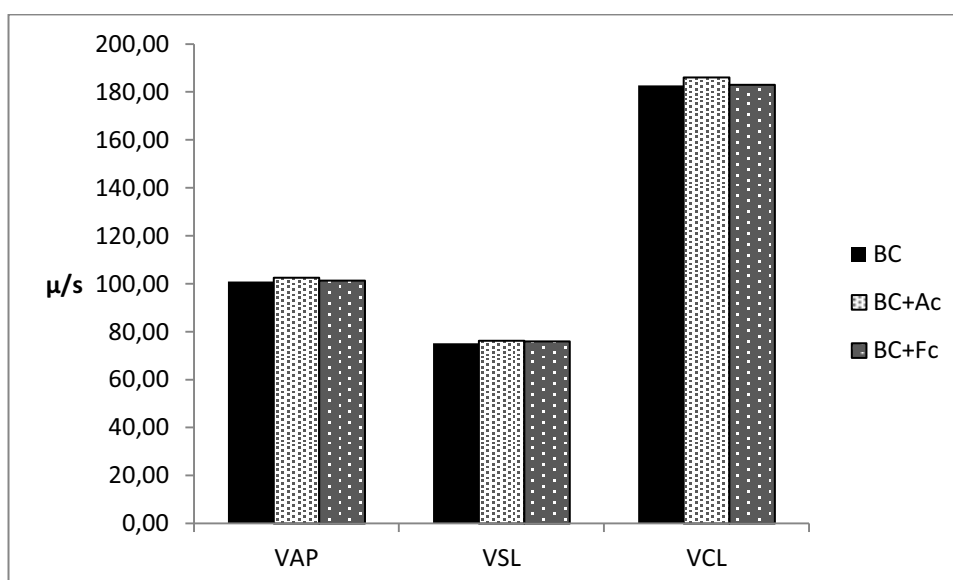


FIGURA 4: Comparação entre os parâmetros de velocidade de trajeto (VAP; $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$) e velocidade curvilinear (VCL; $\mu\text{m/s}$) de sêmen equino congelado com Botu-Crio® (BC), Botu-Crio® acrescido de asolctina de soja (BC+Ac) e Botu-Crio® acrescido de fosfatidilcolina de soja (BC+Fc).

6.2 Experimento II: Avaliação dos índices de fertilidade do sêmen equino criopreservado com Botu-Crio[®], Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja.

O índice de concepção das éguas inseminadas com Botu-Crio[®], Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja (Figura 5) foram, respectivamente: 46,7% (7/15), 13,3% (2/15) e 37,5% (6/16). A partir destes resultados não foi identificada diferença significativa ($P>0,05$) nas taxas de prenhez entre os grupos estudados. Entretanto, foi verificada uma tendência a maior taxa de fertilidade do grupo Botu-Crio[®] quando comparado ao Botu-Crio[®] adicionado de asolctina de soja ($P=0,10$).

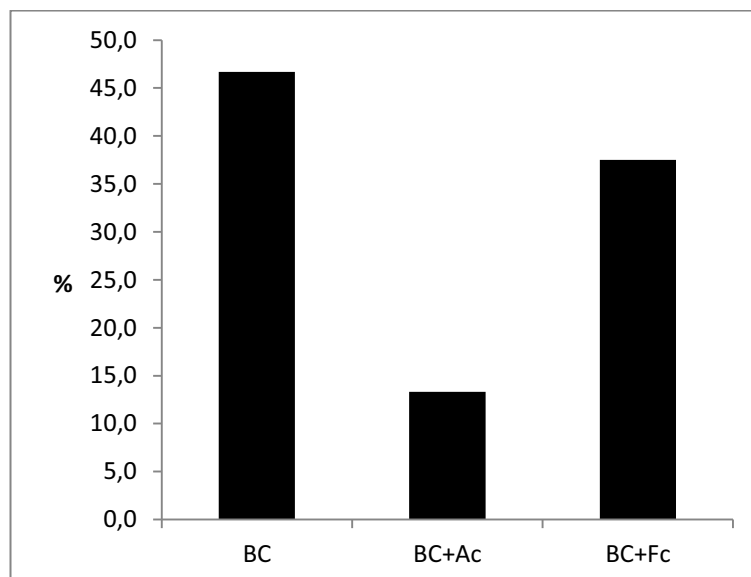


FIGURA 5: Comparação entre os índices de fertilidade de éguas inseminadas com sêmen equino congelado com Botu-Crio[®] (BC), Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja (BC+Ac) e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja (BC+Fc).

Discussão

7 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de diluentes quimicamente definidos tem despertado grande interesse de pesquisadores em diversos países. A maior parte dos meios de diluição de sêmen é composta por leite desnatado e/ou gema de ovo como fonte de lipoproteínas para conferir proteção às células espermáticas do choque térmico e outras injúrias.

Os meios a base de lecitina de soja ou contendo lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foram desenvolvidos para substituir a gema de ovo e leite mediante o argumento de que os componentes de origem animal representam um potencial risco de contaminação microbiológica. Entretanto, pouco se conhece sobre o efeito da associação dos lipídeos da soja aos lipídeos da gema de ovo no sêmen equino criopreservado, propósito desta pesquisa.

No presente estudo, adicionou-se asolctina de soja ao diluente Botu-Crio[®] e fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] com o intuito de verificar se a união entre os lipídeos da soja e da gema de ovo proporcionam maior proteção ao espermatozoide de garanhões e maior índice de fertilidade. Em contrapartida aos outros relatos descritos na literatura, neste trabalho a gema de ovo não foi substituída pela lecitina de soja, mas sim, associada à mesma.

Os resultados encontrados no Experimento I permitiram constatar que tanto a adição da asolctina de soja quanto a adição de fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] foi similarmente eficaz ao diluente convencional Botu-Crio[®] no que se refere à integridade de membrana plasmática e aos parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva, velocidade de trajeto, velocidade linear progressiva, velocidade curvilínea e espermatozoides rápidos. Estes resultados corroboram com os descritos por: Ricker et al. (2006); Felício et al. (2007); Papa et al. (2011), que também trabalharam com a espécie equina. Estudos envolvendo outras espécies, como: bovina (HINSCH et al., 1997); bubalina (AKHTER et al., 2010); ovina (GIL et al., 2003a; FOROUZANFAR et al., 2010; PAZ et al., 2010; KASIMANICKAM et al., 2011); canina (KMENTA et al., 2011) e humana (JEYENDRAN et al., 2008; REED et al., 2009) obtiveram resultados similares.

No que se refere aos parâmetros espermáticos e integridade de membrana, os resultados obtidos no Experimento I foram semelhantes aos

encontrados por Ricker et al. (2006). Tanto a presença da fosfatidilcolina de soja quanto da fosfatidilcolina de ovo nos meios de diluição promoveu diminuição dos danos causados pelo processo de congelação e descongelação por se associarem à superfície da membrana. No Experimento I, a associação entre os lipídeos da soja e da gema de ovo mantiveram esta característica comparada ao diluente composto apenas por gema de ovo. Papa et al. (2011) também concluíram que diluentes a base de lecitina de soja são tão eficientes quanto o meio a base de gema de ovo na criopreservação do sêmen equino ao compararem o Botu-Crio[®] com diferentes concentrações de BCLS (Botu-Crio[®] sem gema de ovo e com lecitina de soja).

Diferente deste estudo, Dell'Aqua Jr. et al. (2007) e Zhang et al. (2009) observaram superioridade dos meios a base de lecitina de soja em relação aos meios à base de gema de ovo ao avaliarem sêmen congelado de bovinos e javalis, respectivamente. Entretanto, Zhang et al. (2009) verificaram que quanto maior a concentração da lecitina de soja utilizada nos diluentes, menor é a porcentagem de membrana plasmática íntegra e de motilidade espermática. Este achado foi atribuído ao fato da lecitina de soja ser menos viscosa que a gema de ovo. Conforme a concentração de lecitina de soja é elevada, a viscosidade aumenta, dificultando a movimentação espermática. Aires et al. (2003) também sugeriram que melhores resultados de motilidade no meio à base de lecitina de soja pode ser consequência da alta viscosidade e presença de debris nos diluidores compostos por gema de ovo, afetando a função espermática. A combinação da asolctina de soja e da fosfatidilcolina de soja com a gema de ovo não alterou a viscosidade do meio no presente estudo, uma vez que a adição de OEP (agente emulsificante) e o processo de centrifugação são responsáveis por diminuir a viscosidade, não havendo alteração na motilidade espermática.

Discordando dos achados deste trabalho, alguns pesquisadores perceberam piora na qualidade do sêmen criopreservado com diluente à base de lecitina de soja. Wagtendonk-de Leeuw et al. (2000) afirmaram que os efeitos benéficos exercidos pela gema de ovo dificilmente são alcançados por outros agentes. Estes autores observaram motilidade superior no sêmen bovino congelado com meio a base de gema de ovo, provavelmente, pela maior viscosidade e presença de debris no meio Biociphos Plus[®], o qual

apresentou comprometimento na fertilidade. O mesmo foi observado por Thun et al. (2002) ao compararem o diluidor Tris-gema com Biociphos-Plus[®] e por Celeghini et al. (2008) ao confrontarem os meios Botu-Bov[®] e Bioexcell[®].

Forouzanfar et al. (2010) sugerem que altas concentrações de lecitina de soja podem ser tóxicas ao espermatozoide, prejudicando a motilidade e viabilidade, enquanto elevadas concentrações de gema de ovo são necessárias para preservar estas características. Este efeito tóxico da lecitina de soja não foi observado no Experimento I.

No Experimento II, os índices de prenhez foram semelhantes entre os grupos testados. A adição de asolctina de soja e de fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] não interferiu negativamente na estrutura do espermatozoide e, conseqüentemente, na capacidade de fertilização. Entretanto, houve uma tendência à maior taxa de fertilidade do diluente Botu-Crio[®] em relação ao diluente associado à asolctina de soja. Possivelmente, a concentração de asolctina utilizada pode ter acarretado uma maior inibição dos fatores ligados à capacitação devido a um aumento na rigidez da membrana, como observado por Zahn et al. (2002) ao incorporarem colesterol na membrana de espermatozoides de equinos, prejudicando o processo de fertilização. Ao realizarem a inclusão do colesterol por meio da ciclodextrina na membrana plasmática, estes autores perceberam que a fertilidade do sêmen equino congelado reduziu consideravelmente. O baixo número de inseminações pode ter mascarado uma diferença estatística no presente estudo.

Em pesquisa realizada por Zeron et al. (2002), foi constatado que a fosfatidilcolina de ovo (fosfolípídeo fluido) diminuiu a temperatura de transição lipídica da membrana espermática e reduziu, conseqüentemente, a sensibilidade ao processo de refrigeração. Entretanto, a dipalmitoilfosfatidilcolina, fosfolípídeo sintético mais rígido que a fosfatidilcolina de ovo, obteve o efeito oposto por permitir menor mobilidade entre os constituintes da membrana. A asolctina de soja, assim como a dipalmitoilfosfatidilcolina, provavelmente possui uma rigidez maior que os lipídeos da gema de ovo, o que pode ter, discretamente, dificultado o processo de fertilização pela forte interação com a membrana plasmática.

Ricker et al. (2006) relataram semelhança estatística em estudo preliminar de fertilidade dos meios INRA82[®] com fosfatidilcolina de soja e INRA82[®] com fosfatidilcolina de ovo, concordando com os achados do Experimento II. Papa et al. (2011) também não observaram diferença nos índices de concepção nos meios compostos por lecitina de soja nas concentrações de 10g/L e 20g/L comparados com meio a base de gema de ovo. Entretanto, observaram índice de fertilidade inferior ao Botu-Crio[®] quando substituíram a gema de ovo por uma concentração elevada de lecitina de soja (45g/L), confirmando o efeito prejudicial da lecitina em concentrações muito altas. Isto foi atribuído a fatores como: aderência maciça dos lipídeos da lecitina de soja na superfície da membrana plasmática em função da alta concentração; modificações da composição da membrana; forte interação dos lipídeos da lecitina de soja com a membrana; inibição dos fatores ligados à capacitação pela elevada concentração de lecitina de soja.

Os resultados obtidos no Experimento II estão em consonância com Gil et al. (2003b), os quais estudaram a taxa de fertilidade do sêmen congelado de carneiros utilizando o Bioexcell[®] e um outro diluente à base de leite e gema de ovo, não havendo diferença estatística entre os meios testados. O mesmo resultado foi obtido por Fukui et al. (2008), constatando que o meio a base de lecitina de soja Andromed[®] pode substituir diluentes a base de gema de ovo no sêmen ovino criopreservado.

Novos estudos devem ser conduzidos para que se consiga obter uma concentração mínima de lecitina de soja em substituição à gema de ovo nos diluentes de congelação, evitando o aumento da viscosidade do meio e a aderência maciça na superfície da membrana plasmática dos espermatozoides prejudicando, conseqüentemente, a motilidade e fertilidade do sêmen equino congelado.

Conclusão

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitiram concluir que:

- tanto a adição da asolctina de soja quanto da fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] apresentaram eficácia similar ao diluente Botu-Crio[®] convencional no que se refere aos parâmetros espermáticos do sêmen criopreservado de garanhões;
- a associação dos lipídeos da asolctina de soja à gema de ovo e da fosfatidilcolina de soja à gema de ovo conferiram o mesmo grau de proteção à membrana plasmática do espermatozoide congelado com o diluente convencional Botu-Crio[®];
- os índices de fertilidade do sêmen criopreservado de garanhões foi semelhante entre os diluentes Botu-Crio[®], Botu-Crio[®] adicionado de asolctina de soja e Botu-Crio[®] adicionado de fosfatidilcolina de soja. Entretanto, houve uma tendência a maior taxa de fertilidade do diluente Botu-Crio[®] quando comparado ao diluente associado à asolctina de soja.

Bibliografia

9 BIBLIOGRAFIA:

AIRES, V.A.; HINSCH, K.D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, v.60, p.269-279, 2003.

AITKEN, R.J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance benefit and risk. *Bioassays*, v.16, n.4, p.259-267, 1994.

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A.; ANDRABI, S.M.H.; IQBAL, S.; ULLAH, N. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell®. *Theriogenology*, v.74, p.951-955, 2010.

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; ANDRABI, S.M.H.; RAKHA, B.A.; ULLAH, N.; KHALID, M. Soya-lecithin in Extender Improves the Freezability and Fertility of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, p.1-5, 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MARTIN, R.; KEITH, R.; PETER, W. Organização interna da célula: estrutura da membrana. In:_____.*Biologia Molecular da célula*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap.10, p.583-595.

ALMEIDA, J.P. *Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação de sêmen equino*. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

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.105-113, 2005.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology*, v.13, p.232-241, 1992.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. cap.80, p.717-718.

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

AMORIM, P.K.R. *Efeito da criopreservação sobre características estruturais e funcionais do espermatozóide equino (equus caballus)*. 2006. 59f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes.

ARIFIANINI, R.I.; YUSUF, T.L. Developing of tris soy milk diluent for frisian holstein bull frozen semen. *Journal of Biosciences*, v.17, n.2, p.91-94, 2010.

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

AURICH, C.; SEEBER, P.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F. Comparison of Different Extenders with Defined Protein Composition for Storage of Stallion Spermatozoa at 5°C. *Reproduction of Domestic Animals*, v.42, p.445-448, 2007.

AVANZI, B.R.; RAMOS, R.S.; NICHI, M.; FIORATTI, E.G.; DELL'AQUA JR., J.A.; WECHSLER, F.S.; PAPA, F.O. Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas. *Veterinária e Zootecnia*, v.18, n.2, p.226-238, 2011.

BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.257-267, 2008.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, v.22, p.1061-1069, 2001.

BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v.21, n.2, p.47-51, 1957.

BITTENCOURT, R.F.; FILHO, A.L.R.; LIMA, M.C.C.; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS, M.F.; BISCARDE, C.E.; LEAL, L.S.; OBA, E. Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. *Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science*, v.45, n.4, p.305-312, 2008.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science*, v.65, p.75–88, 2001.

BRANDÃO, A.C. *Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade de membranas plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides criopreservados de equinos*. 2008. 87f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; FRENEAU, G.E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.38, p.33-38, 2002.

CAVALCANTE, M.B.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, D.O.; TELES, E.P.B. Criopreservação de sêmen humano - comparação entre métodos de congelação e tipos de envase. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v.28, n.12, p.708-714, 2006.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*, v.104, p.119-131, 2008.

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Espermatogênese em mamíferos. *Scientia*, v.4, n.1/2, p.53-72, 2003.

CRITSER, J.K.; BENSON, J. Fundamental Cryobiology. In: SQUIRES, E.; WADE, J.F. **Proceedings of a workshop on transporting gametes and embryos**. Newmarket: R & W Publications, 2003. P.65-69 (Havemeyer Foundation Monograph Series, 12).

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

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. The plasma membrane. In_____. *Molecular cell biology*. 2.ed. New York: Scientific American Books, 1990. Chap.13, p.491-530.

DEL VALLE, I.; GÓMEZ-DURÁN, A.; HOLT, W.V.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of Andrology*, 2011. No Prelo.

DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; 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.315-365, 2001.

DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; FREITAS, C.P.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; CRESPILO, A.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ALBERTI, K.; DE VITA, B.; BARCELLOS, G.; MEDEIROS, A.S.L. Nova proposta de diluidor para sêmen bovino quimicamente definido. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, Supl.3, p.1001, 2007.

DOBRINSKI, I.; THOMAS, P.G.A.; BALL, B.A. Cryopreservation reduces the ability of equine spermatozoa to attach to oviductal epithelial cells and zonae pellucidae in vitro. *Journal of Andrology*, v.16, n.6, p.536-542, 1995.

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. 1994. Chap.2, p.29-77.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, v.3, p.1-13, 1996.

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

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.251-260, 1996.

FELÍCIO, B.G.; DE VITA, B.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; TRINQUE, C.; DELL'AQUA JR., J.A.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.G.; CASTRO, F.T.; FERREIRA, H.N.; FREITAS, C.P.; CRESPILO, A.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ALBERTI, K.; MEDEIROS, A.S.L. Novo diluidor quimicamente definido para congelação de semen equino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, Supl.3, p.1003, 2007.

FELIPE-SILVA, A.S.; VALE FILHO, V.R.; FERREIRA, M.B.D.; CORREA, G.S.S.; SILVA, M.A.; VERAS, M.M.; ANDRADE, V.J. Efeitos do diluidor na viabilidade espermática pós-criopreservação em tourinhos da raça Gir Leiteiro aos 25 meses de idade, pré-selecionados pela classificação andrológica por pontos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, n.1, p.81-86, 2011.

FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S.M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H.R.; NASR-ESFAHANI, M.H. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, v.73, p.480-487, 2010.

FREITAS, C.P.; DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; CRESPILO, A.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ALBERTI, K.; DE VITA, B.; BARCELLOS, G.; MEDEIROS, A.S.L. Botu-Bov Egg Free® e Tris-gema de ovo na criopreservação de sêmen de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*). *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, Supl.3, p.1002, 2007.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after Artificial Insemination Using a Soybean-Based Semen Extender in Sheep. *Journal of Reproduction and Development*, v.54, n.4, p.286-289, 2008.

FÜRST, R. *Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino*. 2006. 96f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GARNIER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. *Reprodução animal*. 7.ed. São Paulo: Manole, 2003. cap.7, p.97-110.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*, v.59, p.1241-1255, 2003a.

GIL, J.; RODRIGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, v.59, p.1157-1170, 2003b.

GONZALEZ, R.A.F. *Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana do espermatozoide bovino*. 2004. 92f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Criobiology*, v.29, p.26-28, 1992.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, v.11, n.1, p.73-88, 1990.

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.

HINSCH, E.; HINSCH, K-D.; BOEHM, J.G.; SCHILL, W-B.; MUELLER-SCHLOESSER, F. Functional parameters and fertilization success of bovine semen cryopreserved in egg-yolk free and egg-yolk containing extenders. *Reproduction in Domestic Animals*, v.32, p.143-149, 1997.

HOFFMANN, N.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Animal Reproduction Science*, v.125, p.112-118, 2011.

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

HOOGEWIJS, M. *Automated and Standardized analysis of equine semen and influences of centrifugation on equine semen preservation*. 2010. 232f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Ghent, Merelbeke.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Veterinária*, v.10, n.2, p.156-165, 1994.

JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.37, n.6, p.1241–1252, 1992.

JEYENDRAN, R.S.; ACOSTA, V.C.; LAND, S.; COULAM, C.B. Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium. *Fertility and Sterility*, v.90, n.4, p.1263-1265, 2008.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; TIBARY, A.; PELZER, K. Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. *Small Ruminant Research*, v.99, p.208-213, 2011.

KMENTA, I.; STROHMAYER, C.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F.; SCHÄFER, SOMI, S. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. *Theriogenology*, v.75, p.1095-1103, 2011.

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

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

LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.D.; SCHABENBERGER, O. SAS for Mixed Models. 2.ed. Cary: SAS Institute Inc., 2006.

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

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

LORENZONI, S.R.G. *Criopreservação de sêmen equino envasado em criotubo*. 2010. 65f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MAZIERO, R.R.D.; GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; AVANZI, B.R.; HARTWIG, F.P.; LISBOA, F.P.; MARTIN, I.; PAPA, F.O. Evaluation of sperm kinetics and plasma membrane integrity of frozen equine semen in different storage volumes and freezing conditions. *Journal of Equine Veterinary Science*, xxx, p.1-4, 2012.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, v.247, p.C125-C142, 1984.

MEDEIROS, A.S.L. *Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões*. 2003. 78f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327-344, 2002.

MELO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, p.757-763, 2005.

MORTIMER, S.T.; SCHOËVAËRT, D.; ANNE SWAN, M.; MORTIMER, D. Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. *Human Reproduction*, v.12, n.5, p.1006-1012, 1997.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.

OLIVEIRA, C.H. *Avaliação das características do espermatozoide eqüino congelado submetido a inclusão e remoção do colesterol das membranas*. 2007. 84f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; MACÍAS GARCÍA, 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, p.393–403, 2009.

PAPA, F.O.; FELÍCIO, G.B.; MELO-OÑA, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DE VITA, B.; TRINQUE, C.; PUOLI-FILHO, J.N.P.; DELL'AQUA JR., J.A. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science*, v.129, p.73-77, 2011.

PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.G.; DELL'AQUA JR., J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.293-301, 2008.

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

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

PAZ, P.; ESTESO, M.C.; ALVAREZ, M.; MATA, M.; CHAMORRO, C.A.; ANEL, L. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology*, v.74, p.663-671, 2010.

PEIXOTO, A.L.V.A.; MONTEIRO JR., P.L.J.; CÂMARA, D.R.; VALENÇA, R.M.B.; SILVA, K.M.G.; GUERRA, M.M.P. Efeito do tempo de incubação pós-descongelamento sobre a viabilidade de espermatozoides ovinos criopreservados com tris-gema suplementado com vitamina c e trolox. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v.11, n.1, p.16-24, 2008.

PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation. In: TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS, 1986, Fort Collins. *Proceedings...* Fort Collins: Colorado State University, 1986, p.1-5.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In:_____. McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. cap.83, p.769-789.

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

REED, M.L.; EZEH, P.C.; HAMIC, A.; THOMPSON, D.J.; CAPERTON, C.L. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. *Fertility and Sterility*, v.92, n.5, p.1787-1790, 2009.

RICKER, J.V.; LINFOR, J.J.; DELFINO, W.J.; KYSAR, P.; SCHOLTZ, E.L.; TABLIN, F.; CROWE, J.H.; BALL, B.A.; MEYERS, S.A. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. *Biology of reproduction*, v.74, p.359-365, 2006.

ROOF, D.J.; BOWLEY, S.; PRICE, L.L.; MATSAS, D.J. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology*, v.77, p.412-420, 2012.

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

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

SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.4, p.370-384, 2011.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1056-1065, 2004.

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

SUTOVSKY, P.; MANANDHAR, G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. In: JONGE, C.; BARRAT, C. *The sperm cell*. New York: Cambridge University Press, 2006. chap.1, p.1-30.

- TERRACIANO, P.B.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; MIQUELITO, L.V.; ARLAS, T.R.; CASTRO, F.; MATTOS, R.C.; PASSOS, E.P.; OBERST, E.R.; LIMA, E.O.C. Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. *Ciência Rural*, v.38, n.7, p.1972-1977, 2008.
- THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus 1 and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1087-1094, 2002.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P.; EVAÏN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, v.48, p.907-917, 1997.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.23-53, 2000.
- WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.V.; HARING, R.M.; KAAL-LANSBERGEN, L.M.T.E.; DEN DAAS, J.H.G. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*, v.54, p.57-67, 2000.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, v.7, p.871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.481-492, 2000.
- WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.62, p.483-492, 1981.
- WILLIAMS, A.C.; FORD, W.C.L. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. *Fertility and Sterility*, v.83, p.929-936, 2005.

ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JR., J.A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology*, v.58, p.237-240, 2002.

ZERON, Y.; TOMCZAK, M.; CROWE, J.; ARAV, A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology*, v.45, p.143-152, 2002.

ZHANG, S.S.; HU, J.H.; LI, Q.W.; JIANG, Z.L.; ZHANG, X.Y. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology*, v.8, n.22, p.6476-6480, 2009.

Trabalho Científico

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho escrito nas normas e enviado para o Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

EFEITO DA ADIÇÃO DA ASOLCTINA E FOSFATIDILCOLINA DE SOJA EM MEIO À BASE DE GEMA DE OVO SOBRE OS PARÂMETROS ESPERMÁTICOS E FERTILIDADE DE SÊMEN CONGELADO DE GARANHÕES

EFFECT OF THE ADDITION OF SOYBEAN ASOLECTIN AND PHOSPHATIDYLCHOLINE IN AN EGG YOLK-BASED EXTENDER ON SPERM PARAMETERS AND FERTILITY OF FROZEN STALLION SEMEN

Rocha, A.S.; Martin, I.; Monteiro, G.A.; Nascimento, P.G.; Sancler-Silva, Y.F.R.; Papa, F.O.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP-Botucatu)

Distrito de Rubião Junior, s/nº, Botucatu-SP. CEP: 18618-970

(14) 8816-5736. E-mail: aline-srocha@hotmail.com

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição da asolctina ou da fosfatidilcolina de soja em diluente a base de gema de ovo sobre parâmetros espermáticos e fertilidade de sêmen equino congelado. No Experimento I, dezenove ejaculados de três garanhões foram criopreservados utilizando três diluentes: Botu-Crio[®] (BC), Botu-Crio[®] adicionado de asolctina de soja (BC+Ac) e Botu-Crio[®] adicionado de fosfatidilcolina de soja (BC+Fc), para avaliação dos parâmetros de cinética espermática e integridade de membrana plasmática. No Experimento II, comparou-se a taxa de fertilidade referente aos três meios de congelação por meio de inseminação artificial das éguas com “pool” de espermatozoides dos três garanhões. Não houve diferença significativa no que se refere aos parâmetros espermáticos de motilidade total ($69,16 \pm 9,28$; $64,63 \pm 11,05$; $68,47 \pm 7,92$), motilidade progressiva ($25,00 \pm 5,43$; $23,26 \pm 5,63$; $26,16 \pm 5,50$), integridade de membrana plasmática ($39,37 \pm 8,82$; $39,95 \pm 9,52$; $41,63 \pm 9,24$) e índice de concepção (46,7%, 13,3%, 37,5%) entre os meios BC, BC+Ac e BC+Fc, respectivamente. Entretanto, existiu uma tendência a maior taxa de fertilidade do diluente Botu-Crio[®] quando comparado ao meio adicionado de asolctina de soja. Conclui-se que tanto a adição da asolctina de soja

quanto da fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] apresenta a mesma eficácia que o diluente Botu-Crio[®] na criopreservação de sêmen equino.

Palavras-chave: criopreservação, garanhão, lecitina de soja, sêmen

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of addition of soybean asolectin and phosphatidylcholine in an egg yolk-based extender on sperm parameters and fertility of frozen equine semen. In Experiment I, nineteen ejaculates from three stallions were submitted to cryopreservation process using three freezing extenders: Botu-Crio[™] (BC), Botu-Crio[™] with soybean asolectin (BC+Ac) and Botu-Crio[™] with soybean phosphatidylcholine (BC+Fc), for further evaluation of kinetic parameters and sperm plasma membrane integrity. In Experiment II, the fertility rates from the three freezing extenders were compared through artificial insemination in mares using a sperm “pool” of three stallions. No significant differences were found on sperm parameters of total motility (69.16 ± 9.28 ; 64.63 ± 11.05 ; 68.47 ± 7.92); progressive motility (25.00 ± 5.43 ; 23.26 ± 5.63 ; 26.16 ± 5.50); plasma membrane integrity (39.37 ± 8.82 ; 39.95 ± 9.52 ; 41.63 ± 9.24) and fertility rates (46.7%, 13.3%, 37.5%), for the BC, BC+Ac and BC+Fc groups, respectively. However, the tendency toward higher ($P > 0.05$) fertility rates in Botu-Crio[™] (BC) freezing extender than the freezing extender containing soybean asolectin (BC + Ac). Based in these results, it is concluded that the both addition of soybean asolectin and phosphatidylcholine to Botu-Crio[™] freezing extender has the same effectiveness as the conventional Botu-Crio[™] used in the cryopreservation of equine semen.

Keywords: cryopreservation, stallion, soybean lecithin, semen

INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia de grande impacto na indústria equina, uma vez que permite a maximização do potencial genético do reprodutor, permitindo maior número de descendentes de garanhões de alto valor genético, bem como o armazenamento de material genético de animais que não possam, temporária ou permanentemente, ser utilizados com fins reprodutivos; reduz os custos de transporte e aumenta o controle de doenças sexualmente transmissíveis (SQUIRES et al., 1999).

Apesar das inúmeras vantagens na utilização do sêmen congelado, seu uso tem sido limitado pela redução da fertilidade ocasionada durante o processo de congelação-descongelação do sêmen de alguns ganhos (SQUIRES et al., 2004), havendo diminuição na viabilidade da célula espermática (WATSON, 2000; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009). Os ganhos podem ser classificados como bons congeladores ou maus congeladores, de acordo com as características de motilidade espermática pós-descongelação (HOFFMAN et al., 2011), podendo ocorrer variações não apenas entre diferentes ganhos, mas entre ejaculados de um mesmo reprodutor.

Os diluidores de sêmen são constituídos por substâncias que permitem a preservação da integridade da membrana plasmática mediante a estabilização do pH do meio, a neutralização de produtos tóxicos produzidos pelos espermatozoides, a proteção contra o choque térmico, a manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico, a inibição do crescimento bacteriano e o fornecimento de energia (FURST, 2006). Os aspectos que determinam o sucesso da criopreservação são a toxicidade e o estresse osmótico que as células espermáticas são expostas quando utilizadas altas concentrações de crioprotetores (ALVARENGA et al. 2005), sendo a gema de ovo, o leite e o glicerol os mais comumente encontrados nos meios de congelação.

O leite e a gema de ovo auxiliam na estabilização da membrana plasmática durante os ciclos de congelação e descongelação, prevenindo as injúrias causadas pelo choque térmico (ARIFIANTINI e YUSUF, 2010). Entretanto, por questões ligadas ao risco de veiculação de agentes contaminantes, diluidores a base de lecitina de soja tem sido testados para substituir os componentes de origem animal nos meios de congelação de sêmen e para otimizar a qualidade do mesmo.

Os diluentes de congelação compostos por lecitina de soja têm sido incluídos em estudos realizados com sêmen de diversas espécies e os resultados promissores incentivam ainda mais a busca pela concentração ideal deste componente para minimizar os danos provocados pelo processo de criopreservação (HINSCH et al., 1997; GIL et al., 2003a; RICKER et al., 2006; FELÍCIO et al., 2007; JEYENDRAN et al., 2008; REED et al., 2009; FOROUZANFAR et al., 2010; PAZ et al., 2010; AKHTER et al., 2010; AKHTER et al., 2011; PAPA et al., 2011; KASIMANICKAM, 2011; KMENTA et al., 2011).

Apesar dos diversos estudos envolvendo diluentes livres de componentes de origem animal, pouco se conhece sobre a associação entre os lipídeos da lecitina de soja e os lipídeos da gema de ovo nos meios de congelação para criopreservação do sêmen

equino. Neste intuito, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição da asolctina de soja ou da fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade do sêmen congelado de garanhões.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa em questão atendeu aos requisitos impostos pela Comissão de Ética no uso de animais de acordo com os princípios éticos na experimentação animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, campus Botucatu, recebendo o protocolo número 210/2011 – CEEA.

Foram conduzidos 2 experimentos complementares de acordo com os objetivos propostos. No Experimento I, foi verificado o efeito da adição da asolctina de soja¹ ou da fosfatidilcolina de soja² ao diluente Botu-Crio[®] sobre os parâmetros espermáticos e integridade de membrana do sêmen equino congelado. No Experimento II, foram avaliados os índices de fertilidade do sêmen equino criopreservado com Botu-Crio[®], Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja.

Para as atividades referentes ao Experimento I, foram utilizados três garanhões das raças Puro Sangue Inglês, Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, submetidos a regime regular de colheita de sêmen, pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, SP.

A colheita do sêmen, análise laboratorial, processamento, congelação e estocagem das amostras foram conduzidos no CERAN (Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal) pertencente ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, SP.

Os dois diluentes de congelação foram preparados utilizando-se como base os componentes presentes no Botu-Crio[®]. Para isso, foi adicionado OEP (orvus-Es paste) à água e esta solução foi separada em 2 amostras: uma recebeu adição de asolctina de soja na concentração de 10g/L e outra, de fosfatidilcolina de soja na concentração de 10g/L. Depois do acréscimo dos lipídeos da soja, as amostras foram homogeneizadas e a

¹ Sigma 11145 (Asolctina obtida de soja)

² Sigma P5638 (L- α -Phosphatidylcholine from soybean, Type II-S)

solução base “*powder*” presente no Botu-Crio[®] foi adicionado a cada uma, sendo novamente homogeneizada. Em seguida, foram levadas à centrífuga refrigerada (Cientec, CT-6000 R) à 5°C por 99 minutos, foi retirado o sobrenadante, realizada a correção do pH e da osmolaridade, adicionado o crioprotetor e realizado o armazenamento à -20°C em frascos contendo 100mL.

Previamente a colheita dos ejaculados, foi realizada a higienização do pênis dos garanhões com água corrente para a remoção das sujidades. O sêmen foi colhido com a utilização de vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma Botucatu/ME Ltda., SP, Brasil), com temperatura entre 40°C e 42°C, em manequim inanimado.

Após a colheita, o sêmen foi imediatamente filtrado para remoção da fração gel e de sujidades. A concentração espermática foi avaliada com auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico de contraste de fase, sob o aumento de 200X, utilizando o fator de diluição de 1 parte de sêmen para 19 partes de água destilada. O número de espermatozoides contados foi multiplicado por 1000 e expresso em número de espermatozoides por milímetro cúbico (mm³).

Os parâmetros de cinética espermática foram avaliados por análise computadorizada dos movimentos espermáticos - CASA (HTM-IVOS 12; Hamilton-Thorne Research, Danvers, MA, USA), depositando-se uma alíquota de 10µL de sêmen em uma câmara de Makler (Makler Counting Chamber[®], Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) pré-aquecida a 37°C. Em cada amostra foram avaliadas, no mínimo, 500 células.

Para a criopreservação do ejaculado, foi empregada a técnica descrita por Papa et al. (2008), na qual o sêmen foi diluído em meio diluente à base de leite desnatado e glicose (Botu-Sêmen[®], Botupharma Botucatu/ME Ltda., SP, Brasil) em uma proporção de 1:1 (meio:sêmen) e, posteriormente, dividido em três alíquotas que foram centrifugadas a 600xg por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os *pellets* ressuspensos para a concentração de 200x10⁶ de espermatozóides viáveis/mL, sendo uma amostra com meio diluente de congelação Botu-Crio[®] (Botupharma Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil), uma amostra com Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja e outra com Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja.

As amostras de cada protocolo foram envasadas em palhetas francesas de 0,5mL, previamente identificadas com o nome do garanhão, partida da colheita do ejaculado e protocolo de congelação e, em seguida, lacradas com álcool polivinílico. As

palhetas foram distribuídas em uma grade e refrigeradas a 5°C durante 20 minutos em geladeira Minitub[®] (Minitub do Brasil Ltda), na taxa de 0,5°C/minuto e, decorrido este período, foram destinadas a congelação na máquina automatizada TK[®] 4000C (TK Tecnologia em Congelação Ltda, Uberaba, Minas Gerais, Brasil), na velocidade de 15°C/minuto entre 5°C e -10°C e velocidade de 40°C/minuto entre -10°C e -140°C. Após, foram imersas em nitrogênio líquido e estocadas em botijão.

As palhetas foram descongeladas em banho-maria, a 46°C por 20 segundos, segundo a técnica descrita por Dell'Aqua Jr. et al. (2001). A análise de cinética espermática das amostras foi realizada por meio do método computadorizado, considerando as seguintes variáveis: motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, µm/s); velocidade linear progressiva (VSL, µm/s); velocidade curvilínea (VCL, µm/s); e espermatozoides rápidos (RAP; %).

A Integridade da Membrana Plasmática (IMP, %) foi analisada pela combinação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína, permeável às células com membrana íntegra, e iodeto de propídio, permeável às células com membrana lesada, de acordo com a técnica descrita por Harrison & Vickers (1990). As amostras foram analisadas entre lâmina e lamínula em microscópio de epifluorescência, sob aumento de 400x. Foram contadas 100 células espermáticas, sendo consideradas íntegras as células emitindo fluorescência verde e, lesadas, as com fluorescência vermelho ou verde e vermelho. O resultado foi expresso em porcentagem de células íntegras.

Na segunda etapa experimental, foram utilizadas 19 éguas pertencentes ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, SP.

O teste de fertilidade foi realizado no CERBEQ (Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina), no Posto de Monta, Campus do Lageado – FMVZ – UNESP – Botucatu - SP.

As éguas foram monitoradas diariamente por palpação retal e ultrassonografia. Quando detectado folículo com diâmetro médio de 35mm, foi administrado 1mg de acetato de deslorelina, por via intramuscular, como indutor da ovulação. Decorridas 33 horas após a indução da ovulação, as éguas foram monitoradas a cada 6 horas até a constatação da ovulação e, então, foram inseminadas de acordo com os grupos a serem testados, totalizando 46 inseminações. Destas, 15 inseminações foram com Botu-Crio[®], 15 com Botu-Crio[®] associado à fosfatidilcolina de soja e 16 com Botu-Crio[®] associado à asolctina de soja.

Na tentativa de excluir possíveis efeitos individuais relacionados aos garanhões utilizados no experimento, optou-se pela inseminação artificial com “pool” de espermatozoides dos três garanhões, evitando-se a influência do reprodutor sobre os índices de fertilidade.

Para a inseminação, foram descongeladas a 46°C, por 20 segundos, duas palhetas de cada garanhão, totalizando 600×10^6 de espermatozoides viáveis pré-congelação. Estes foram depositados na extremidade do corno uterino ipsilateral à ovulação através do desvio por manipulação retal da pipeta flexível (Minitub do Brasil Ltda).

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

No Experimento I, as médias de cada variável resposta entre os grupos testados foram comparadas pela análise de variância (LITTELL et al., 2006; PROC MIXED, SAS Institute, 2009). O teste de Wilcoxon (PROC NPAR1WAY, SAS Institute, 2009) foi utilizado para comparar a porcentagem média de espermatozoides rápidos entre os grupos testados devido à distribuição assimétrica.

No Experimento II, o teste Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher (PROC FREQ, SAS Institute, 2009) foi usado para comparar a proporção de éguas prenhes por grupo. O nível de significância estatística foi definido em 0.05.

RESULTADOS

Os resultados encontrados para cada uma das variáveis do movimento espermático e integridade de membrana de acordo com o meio de diluição utilizado estão demonstrados na Tab.1.

Não foram observados efeitos significativos ($P > 0,05$) entre a associação da asolctina de soja ou da fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] sobre as variáveis de motilidade total (MT, %); motilidade progressiva (MP, %); velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$); velocidade linear progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$); velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$); e espermatozoides rápidos (RAP; %). O mesmo foi verificado em relação à integridade de membrana plasmática, a qual também não diferiu significativamente ($P > 0,05$) entre os meios diluentes testados.

Tabela 1: Valores médios e desvios padrão dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento de sêmen equino congelado com Botu-Crio[®] (BC), Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja (BC+Ac) e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja (BC+Fc).

Variáveis	BC	BC + Ac	BC + Fc
MT (%)	69,16 ± 9,28	64,63 ± 11,05	68,47 ± 7,92
MP (%)	25,00 ± 5,43	23,26 ± 5,63	26,16 ± 5,50
VAP (µm/s)	100,89 ± 14,72	102,47 ± 13,09	101,26 ± 13,78
VSL (µm/s)	75,16 ± 8,47	76,21 ± 8,07	76,00 ± 8,80
VCL (µm/s)	182,74 ± 22,18	186,11 ± 19,52	182,95 ± 21,32
RAP (%)	53,16 ± 12,77	50,00 ± 14,29	53,16 ± 13,28
IMP (%)	39,37 ± 8,82	39,95 ± 9,52	41,63 ± 9,24

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VAP: velocidade de trajeto, VSL: velocidade linear progressiva, VCL: velocidade curvilínea, RAP: espermatozoides rápidos, IMP: integridade de membrana plasmática.

O índice de concepção das éguas inseminadas com Botu-Crio[®], Botu-Crio[®] acrescido de asolctina de soja e Botu-Crio[®] acrescido de fosfatidilcolina de soja foram, respectivamente: 46,7% (7/15), 13,3% (2/15) e 37,5% (6/16). A partir destes resultados não foi identificada diferença significativa ($P > 0,05$) nas taxas de prenhez entre os grupos estudados. Entretanto, foi verificada uma tendência a maior taxa de fertilidade do grupo Botu-Crio[®] quando comparado ao Botu-Crio[®] adicionado de asolctina de soja ($P = 0,10$).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de diluentes quimicamente definidos tem despertado grande interesse de pesquisadores em diversos países. A maior parte dos meios de diluição de sêmen é composta por leite desnatado e/ou gema de ovo como fonte de lipoproteínas para conferir proteção às células espermáticas do choque térmico e outras injúrias. Os meios a base de lecitina de soja ou contendo lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foram desenvolvidos para substituir a gema de ovo e leite mediante o argumento de que os componentes de origem animal representam um potencial risco de contaminação microbiológica. Entretanto, pouco se conhece sobre o efeito da associação dos lipídeos

da lecitina de soja aos lipídeos da gema de ovo no sêmen equino criopreservado, propósito desta pesquisa.

No presente estudo, adicionou-se asolctina de soja ao diluente Botu-Crio[®] e fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] com o intuito de verificar se a união entre os lipídeos da soja e da gema de ovo proporcionam maior proteção ao espermatozoide proveniente de garanhões de baixa congelabilidade e maior índice de fertilidade. Em contrapartida aos outros relatos descritos na literatura, neste trabalho a gema de ovo não foi substituída pela lecitina de soja, mas sim, associada à mesma.

Os resultados encontrados no Experimento I permitiram constatar que tanto a adição da asolctina de soja ao diluente Botu-Crio[®], quanto a adição de fosfatidilcolina de soja a este mesmo diluente, foram similarmente eficazes ao diluente Botu-Crio[®] no que se refere à integridade de membrana plasmática e aos parâmetros espermáticos de motilidade total, motilidade progressiva, velocidade de trajeto, velocidade linear progressiva, velocidade curvilínea e espermatozoides rápidos. Estes achados estão de acordo com os descritos por outros autores que também trabalharam com a espécie equina: Ricker et al. (2006); Felício et al. (2007); Papa et al. (2011) e com outras espécies: Hinsch et al. (1997) – bovinos; Akhter et al. (2010) – bubalinos; Gil et al. (2003a), Forouzanfar et al. (2010), Paz et al. (2010), Kasimanickam et al. (2011) – ovinos; Kmenta et al. (2011) – caninos; Jeyendran et al. (2008), Reed et al. (2009) – humanos.

No que se refere aos parâmetros espermáticos e integridade de membrana, os resultados obtidos no Experimento I foram semelhantes aos encontrados por Ricker et al. (2006). Tanto a presença da fosfatidilcolina de soja quanto da fosfatidilcolina de ovo nos meios de diluição promoveu diminuição dos danos causados pelo processo de congelação e descongelação por se associarem à superfície da membrana. No Experimento I, a associação entre os lipídeos da soja e da gema de ovo mantiveram esta característica comparada ao diluente composto apenas por gema de ovo. Papa et al. (2011) também concluíram que diluentes a base de lecitina de soja são tão eficientes quanto o meio a base de gema de ovo na criopreservação do sêmen equino ao compararem o Botu-Crio[®] com diferentes concentrações de BCLS (Botu-Crio[®] sem gema de ovo e com lecitina de soja).

Diferente deste estudo, Dell'Aqua Jr. et al. (2007) e Zhang et al. (2009) observaram superioridade dos meios a base de lecitina de soja em relação aos meios à base de gema de ovo ao avaliarem sêmen congelado de bovinos e javalis,

respectivamente. Entretanto, Zhang et al. (2009) verificaram que quanto maior a concentração da lecitina de soja utilizada nos diluentes, menor é a porcentagem de membrana plasmática íntegra e de motilidade espermática. Este achado foi atribuído ao fato da lecitina de soja ser menos viscosa que a gema de ovo, porém, conforme a concentração de lecitina de soja é elevada, a viscosidade aumenta, dificultando a movimentação espermática. Aires et al. (2003) também sugeriram que melhores resultados de motilidade no meio à base de lecitina de soja pode ser consequência da alta viscosidade e presença de debris nos diluidores compostos por gema de ovo, afetando a função espermática. A combinação da asolctina de soja e da fosfatidilcolina de soja com a gema de ovo não alterou a viscosidade do meio no presente estudo, uma vez que a adição de OEP (agente emulsificante) e o processo de centrifugação são responsáveis por diminuir a viscosidade, não havendo alteração na motilidade espermática.

Por outro lado, discordando dos achados deste trabalho, alguns pesquisadores perceberam piora na qualidade do sêmen criopreservado com diluente à base de lecitina de soja. Wagtendonk-de Leeuw et al. (2000) afirmaram que os efeitos benéficos exercidos pela gema de ovo dificilmente são alcançados por outros agentes. Estes autores observaram motilidade superior no sêmen bovino congelado com meio a base de gema de ovo, provavelmente, pela maior viscosidade e presença de debris no meio Biociphos Plus[®], o qual apresentou comprometimento na fertilidade. O mesmo foi observado por Thun et al. (2002) ao compararem o diluidor Tris-gema com Biociphos-Plus[®] e por Celeghini et al. (2008) ao confrontarem os meios Botu-Bov[®] e Bioexcell[®]. Forouzanfar et al.(2010) sugerem que altas concentrações de lecitina de soja podem ser tóxicas ao espermatozoide, prejudicando a motilidade e viabilidade, enquanto elevadas concentrações de gema de ovo são necessárias para preservar estas características. Este efeito tóxico da lecitina de soja não foi observado no Experimento I.

No Experimento II, os índices de prenhez foram estatisticamente semelhantes entre os grupos testados, demonstrando que a adição de asolctina de soja ou de fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] não interferiram negativamente na estrutura do espermatozoide e, conseqüentemente, na capacidade de fertilização. Entretanto, houve uma tendência à maior taxa de fertilidade do diluente Botu-Crio[®] em relação ao diluente associado à asolctina de soja. Possivelmente, a concentração de asolctina utilizada pode ter acarretado uma maior inibição dos fatores ligados à capacitação devido a um aumento na rigidez da membrana, como observado por Zahn et

al. (2002) ao incorporarem colesterol na membrana de espermatozoides de equinos, prejudicando o processo de fertilização. Ao realizarem a inclusão do colesterol por meio da ciclodextrina na membrana plasmática, estes autores perceberam que a fertilidade do sêmen equino congelado reduziu consideravelmente. Ainda, o baixo número de inseminações pode ter mascarado uma diferença estatística, efetivamente, no presente estudo.

Em pesquisa realizada por Zeron et al. (2002), foi constatado que a fosfatidilcolina de ovo (fosfolípídeo fluido) diminuiu a temperatura de transição lipídica da membrana espermática e reduziu, conseqüentemente, a sensibilidade ao processo de refrigeração. Entretanto, a dipalmitoilfosfatidilcolina, fosfolípídeo sintético mais rígido que a fosfatidilcolina de ovo, obteve o efeito oposto por permitir menor mobilidade entre os constituintes da membrana. A asolctina de soja, assim como este fosfolípídeo sintético citado anteriormente, provavelmente possui uma rigidez maior que os lipídeos da gema de ovo, o que pode ter, discretamente, dificultado o processo de fertilização pela forte interação com a membrana plasmática.

Ricker et al. (2006) relataram semelhança estatística em estudo preliminar de fertilidade dos meios INRA82[®] com fosfatidilcolina de soja e INRA82[®] com fosfatidilcolina de ovo, concordando com os achados do Experimento II. Papa et al. (2011) também não observaram diferença nos índices de concepção nos meios compostos por lecitina de soja nas concentrações de 10g/L e 20g/L comparados com meio a base de gema de ovo. Entretanto, observaram índice de fertilidade inferior ao Botu-Crio[®] quando substituíram a gema de ovo por uma concentração elevada de lecitina de soja (45g/L), confirmando o efeito prejudicial da lecitina em concentrações muito altas. Isto foi atribuído a fatores como: aderência maciça dos lipídeos da lecitina de soja na superfície da membrana plasmática em função da alta concentração; modificações da composição da membrana; forte interação dos lipídeos da lecitina de soja com a membrana; inibição dos fatores ligados à capacitação pela elevada concentração de lecitina de soja.

Os resultados obtidos no Experimento II estão em consonância com os do trabalho efetuado por Gil et al. (2003b), os quais estudaram a taxa de fertilidade do sêmen congelado de carneiros utilizando o Bioexcell[®] e um outro diluente à base de leite e gema de ovo, não havendo diferença estatística entre os meios testados. O mesmo resultado foi obtido por Fukui et al. (2008), que constataram que o meio a base de

lecitina de soja Andromed[®] pode substituir diluentes a base de gema de ovo no sêmen ovino criopreservado.

Novos estudos devem ser conduzidos para que se consiga obter uma concentração mínima de lecitina de soja em substituição à gema de ovo nos diluentes de congelação, sem que haja aumento da viscosidade do meio e aderência maciça na superfície da membrana plasmática dos espermatozoides que podem, conseqüentemente, prejudicar a motilidade e fertilidade do sêmen equino congelado.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesta pesquisa permitiram concluir que:

- tanto a adição da asolctina de soja quanto da fosfatidilcolina de soja ao diluente Botu-Crio[®] apresentaram eficácia similar ao diluente Botu-Crio[®] convencional no que se refere aos parâmetros espermáticos do sêmen criopreservado de garanhões;
- a associação dos lipídeos da asolctina de soja à gema de ovo e da fosfatidilcolina de soja à gema de ovo conferiram o mesmo grau de proteção à membrana plasmática do espermatozoide congelado com o diluente convencional Botu-Crio[®];
- os índices de fertilidade do sêmen criopreservado de garanhões foi semelhante entre os diluentes Botu-Crio[®], Botu-Crio[®] adicionado de asolctina de soja e Botu-Crio[®] adicionado de fosfatidilcolina de soja. Entretanto, houve uma tendência a maior taxa de fertilidade do diluente Botu-Crio[®] quando comparado ao diluente associado à asolctina de soja.

AGRADECIMENTOS: Fundunesp e Capes

BIBLIOGRAFIA:

AIRES, V.A.; HINSCH, K.D.; MUELLER-SCHLOESSER, F.; BOGNER, K.; MUELLER-SCHLOESSER, S.; HINSCH, E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, v.60, p.269-279, 2003.

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; ANDRABI, S.M.H.; RAKHA, B.A.; ULLAH, N; KHALID, M. Soya-lecithin in Extender Improves the Freezability and Fertility of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Bull Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, p.1-5, 2011. ISSN 0936-6768.

AKHTER, S.; ANSARI, M.S.; RAKHA, B.A.; ANDRABI, S.M.H.; IQBAL, S.; ULLAH, N. Cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen in Bioxcell®. **Theriogenology**, v.74, p.951-955, 2010.

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.105-113, 2005.

ARIFIANTINI, R.I.; YUSUF, T.L. Developing of Tris Soy Milk Diluent for Frisian Holstein Bull Frozen Semen. **Journal of Biosciences**, v.17, n.2, p.91-94, 2010.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.119-131, 2008.

DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; 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.315-365, 2001.

DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; FREITAS, C.P.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; CRESPILO, A.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ALBERTI, K.; DE VITA, B.; BARCELLOS, G.; MEDEIROS, A.S.L. Nova proposta de diluidor para sêmen bovino quimicamente definido. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 (Supl.3), p. 1001, 2007.

FELÍCIO, B.G.; DE VITA, B.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; TRINQUE, C.; DELL'AQUA JR., J.A.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.G.; CASTRO, F.T.; FERREIRA, H.N.; FREITAS, C.P.; CRESPILO, A.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ALBERTI, K.; MEDEIROS, A.S.L. Novo diluidor quimicamente definido para congelamento de semen equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35 (Supl.3), 2007.

FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S.M.; OSTADHOSSEINI, S.; HAJIAN, M.; HOSSEINI, L.; ABEDI, P.; NILI, N.; RAHMANI, H.R.; NASR-ESFAHANI, M.H. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v.73, p.480-487, 2010.

FUKUI, Y.; KOHNO, H.; TOGARI, T.; HIWASA, M.; OKABE, K. Fertility after Artificial Insemination Using a Soybean-Based Semen Extender in Sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v.54, n.4, p.286-289, 2008.

FÜRST, R. *Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino*. 2006. 96f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

GIL, J.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. **Theriogenology**, v.59, p.1241-1255, 2003a.

GIL, J.; RODRÍGUEZ-IRAZOQUI, M.; LUNDEHEIM, N.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for cervical artificial insemination. **Theriogenology**, v.59, p.1157-1170, 2003b.

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.

HINSCH, E.; HINSCH, K-D.; BOEHM, J.G.; SCHILL, W-B.; MUELLER-SCHLOESSER, F. Functional Parameters and Fertilization Success of Bovine Semen Cryopreserved in Egg-yolk Free and Egg-yolk Containing Extenders. **Reproduction in Domestic Animals**, v.32, p.143-149, 1997.

HOFFMANN, N.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. **Animal Reproduction Science**, v.125, p.112-118, 2011.

JEYENDRAN, R.S.; ACOSTA, V.C.; LAND, S.; COULAM, C.B. Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 4, p. 1263-1265, 2008.

KASIMANICKAM, R.; KASIMANICKAM, V.; TIBARY, A.; PELZER, K. Effect of seme extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4°C. **Small Ruminant Research**, v.99, p.208-213, 2011.

KMENTA, I.; STROHMAYER, C.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F.; SCHÄFER, SOMI, S. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, p.1095-1103, 2011.

LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W.; WOLFINGER, R.D.; SCHABENBERGER, O. 2006. SAS for Mixed Models. 2.ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; MACÍAS GARCÍA, 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, p.393-403, 2009.

PAPA, F.O.; FELÍCIO, G.B.; MELO-OÑA, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DE VITA, B.; TRINQUE, C.; PUOLI-FILHO, J.N.P.; DELL'AQUA JR., J.A. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.73-77, 2011.

PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.G.; DELL'AQUA JR., J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.293-301, 2008.

PAZ, P.; ESTESO, M.C.; ALVAREZ, M.; MATA, M.; CHAMORRO, C.A.; ANEL, L. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. **Theriogenology**, v.74, p.663-671, 2010.

REED, M.L.; EZEH, P.C.; HAMIC, A.; THOMPSON, D.J.; CAPERTON, C.L. Soy lecithin replaces egg yolk for cryopreservation of human sperm without adversely affecting postthaw motility, morphology, sperm DNA integrity, or sperm binding to hyaluronate. **Fertility and Sterility**, v.92, n.5, p.1787-1790, 2009.

RICKER, J.V.; LINFOR, J.J.; DELFINO, W.J.; KYSAR, P.; SCHOLTZ, E.L.; TABLIN, F.; CROWE, J.H.; BALL, B.A.; MEYERS, S.A. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. **Biology of reproduction**, v.74, p.359-365, 2006.

SAS Institute. 2009. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.62, p.1056-1065, 2004.

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

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus 1 and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v.57, p.1087-1094, 2002.

WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.V.; HARING, R.M.; KAAL-LANSBERGEN, L.M.T.E.; DEN DAAS, J.H.G. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. **Theriogenology**, v.54, p.57-67, 2000.

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

ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JR., J.A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. **Theriogenology**, v.58, p.237-240, 2002.

ZERON, Y.; TOMCZAK, M.; CROWE, J.; ARAV, A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**, v.45, p.143-152, 2002.

ZHANG, S.S.; HU, J.H.; LI, Q.W.; JIANG, Z.L.; ZHANG, X.Y. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.22, p.6476-6480, 2009.