

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**Avaliação da Fragmentação do DNA Espermático
de Sêmen Refrigerado de Garanhões.**

Marcel Cavalcanti Farrás

**BOTUCATU – SP
2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

Avaliação da Fragmentação do DNA Espermático de Sêmen Refrigerado de Garanhões.

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

Mestrando: Marcel Cavalcanti Farrás

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

**BOTUCATU – SP
2012**

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**

Farrás, Marcel Cavalcanti.

Avaliação da fragmentação do DNA espermático de sêmen refrigerado de
garanhões / Marcel Cavalcanti Farrás. – Botucatu : [s.n.], 2012

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

Orientador: Marco Antônio Alvarenga

Capes: 50504002

1. Equino - Espermatozóides. 2. Sêmen – Criopreservação. 3. DNA.

Palavras-chave: Garanhão; Sêmen refrigerado espermático; Sêmen refrigerado.

Dedicatória

Aos meus pais Ramón Farrás López e Rosangela Crippa Cavalcanti, meus maiores exemplos, que sempre me estenderam as mãos com muito amor e carinho. Este trabalho é fruto da educação que me proporcionaram.

Aos meus queridos irmãos Bruno e Aline, pelo incentivo, amor e companheirismo. Obrigado pelo apoio e exemplo.

Aos meus avós, tios e primos, pelo incentivo, admiração e luta diária em sermos uma família presente.

À Carol, pelo amor, companheirismo e principalmente pela paciência e apoio nos momentos difíceis.

Agradecimentos

Ao **Professor Marco A. Alvarenga**, por orientar e viabilizar este estudo, e pelo seu incentivo e oportunidade proporcionada em adquirir novos conhecimentos.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela bolsa de mestrado (Processo FAPESP: 2009/06835-1) e pelo auxílio à pesquisa (Processo FAPESP: 2010/09387-7), essenciais para o desenvolvimento de nosso trabalho.

Ao **Professor Jaime Gasálvez**, pelos ensinamentos e conversas sobre a fragmentação do DNA espermático.

Ao **Engenheiro Agrônomo Miguel Angel Ramirez** pela sua generosidade e disponibilidade em nos auxiliar em nosso trabalho.

Ao **Tenente Coronel Dr. Crespo e à Prof. Consuelo Dalmau**, pela recepção, disponibilidade e acolhimento em minha visita à Espanha.

Ao **Departamento de Bioestatística**.

Aos **Docentes e Funcionários** do Departamento de Reprodução Animal.

Aos **Funcionários da Pós-Graduação** pela atenção, paciência, disponibilidade e boa vontade, sempre.

Aos meus **AMIGOS** que sempre me incentivaram e me apoiaram nesta jornada.

Aos **Colegas de Pós-Graduação**, pelo empenho, disponibilidade e colaboração.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Resumo.....	09
Abstract.....	10
1. Introdução.....	11
2. Revisão de Literatura.....	15
2.1. Sêmen Refrigerado.....	16
2.2. Diluição e Plasma Seminal.....	18
2.3. Sistemas de Transporte e Taxas de Refrigeração.....	20
2.4. Estrutura do DNA Espermático.....	21
2.4.1. Histonas.....	22
2.4.2. Proteínas de Transição.....	22
2.4.3. Protaminas.....	23
2.5. Fragmentação do DNA Espermático.....	24
2.5.1. Avaliação da Cromatina Espermática.....	27
2.5.1.1. SCDtest (Sperm Chromatin Dispersion Test).....	29
2.5.2. Fragmentação Vs Fertilidade e Perda Embrionária.....	30
3. Objetivos.....	32
4. Materiais e Métodos.....	34
4.1. Animais.....	35
4.2. Colheita dos Ejaculados.....	35
4.3. Processamento do Sêmen.....	35
4.4. Análise da Fragmentação do DNA Espermático.....	38
4.4.1. Teste de Dispersão da Cromatina Espermática.....	38

4.5. Análise Estatística.....	39
5. Resultados.....	40
6. Discussão.....	48
7. Conclusões.....	55
8. Referências Bibliográficas.....	57
9. Anexo.....	74
10. Trabalho Científico.....	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Organograma de Execução.....	37
FIGURA 2. Fotos do Teste Halomax®.....	39
FIGURA 3. Dinâmica da Fragmentação do DNA Espermático.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Média e Desvio Padrão (%) da Motilidade Total.....	43
TABELA 2: Média e Desvio Padrão (%) da Motilidade Progressiva.....	43
TABELA 3: Média e Desvio Padrão da Velocidade Espermática ao Longo de uma Trajetória Média (VAP).....	44
TABELA 4: Média e Desvio Padrão (%) do Percentual de Espermatozoides Rápidos (RAPID).....	44
TABELA 5: Média e Desvio Padrão (%) do Percentual de Espermatozoides que Apresentam Membrana Plasmática Inteira, Acrossomo Inteiro e Alto Potencial Mitocondrial (PIAIA).....	45
TABELA 6: Média e Desvio Padrão (%) do Percentual de Espermatozoides que Apresentam Fragmentação do DNA Espermáticos.....	45
TABELA 7: Média e Desvio Padrão (sDF/hora) da Taxa de Fragmentação do DNA Espermático.....	46

FARRÁS, M. C. **Avaliação da fragmentação do DNA espermático de sêmen refrigerado de garanhões.** Botucatu, 2012. XXp. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido realizados nas diferentes espécies com o intuito de se determinar os fatores envolvidos no processo da fragmentação do DNA espermático. A biologia molecular voltada à área da reprodução tem resultado em inúmeras técnicas para a avaliação da qualidade da cromatina e determinação da fragmentação do DNA espermático. Em trabalhos recentes, um novo teste denominado Halomax® tem se mostrado tão eficiente quanto a outros tradicionais para a avaliação da fragmentação do DNA espermático, apresentando como vantagens a sua praticidade e o fato não requerer o uso de equipamentos de alto custo. O presente experimento teve por objetivo comparar as raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM) quanto à resistência à refrigeração, bem como utilizar o Teste Dispersão de Cromatina Espermática denominado Halomax® para avaliar a fragmentação da cromatina espermática do sêmen refrigerado dos garanhões dessas raças em duas temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado (5°C e 15°C). Os resultados deste trabalho demonstraram que não houve diferença entre as temperaturas de armazenamento (5°C e 15°C), mostrando que ambas são eficientes na manutenção da viabilidade espermática pelo período de 24 horas para ambas as raças estudadas. Além disso, foi observada uma característica espermática superior dos garanhões da raça Quarto de Milha quando comparada aos da raça Mangalarga Marchador, tanto nos parâmetros de velocidade espermática, avaliado pelo CASA, quanto com relação à fragmentação do DNA espermático, revelando uma maior sensibilidade dos animais da raça Mangalarga ao processo de refrigeração do sêmen.

Palavras-chave: Garanhão, Sêmen Refrigerado, Fragmentação do DNA Espermático, Halomax®.

FARRÁS, M. C. **Evaluation of sperm DNA fragmentation in stallions cooling sêmen.** Botucatu, 2012. XXp. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Many studies have been conducted in different species in order to determine the factors involved in the process of sperm DNA fragmentation. Molecular biology studies focused on the reproductive area has resulted in several techniques for assessing the quality of chromatin and sperm DNA fragmentation. Recently, a new test called HALOMAX ® has been shown to be as efficient as other traditional assessment of sperm DNA fragmentation, having the advantage of practicality and not require the use of expensive equipment. The aim of this study was to compare breeds Mangalarga and Quarter Horses for cooling resistance and use the Sperm Chromatin Dispersion Test called HALOMAX ® to evaluate the sperm chromatin fragmentation using two cooled semen storage systems (5°C and 15°C). Our results showed no difference between storage systems (5°C and 15°C), showing that both are effective in maintaining sperm viability for a period of 24 hours for both breeds studied. In addition, the Quarter Horse shown superiority in semen quality parameters assessed by CASA and sperm DNA fragmentation when compared with the Mangalarga, revealing higher sensitivity of the Mangalarga stallions for cooling semen.

Keywords: Stallion, Cooled Semen, Sperm DNA Fragmentation, Halomax®.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a comercialização e o transporte de sêmen, tanto refrigerado como congelado, se tornaram uma das atividades mais frequentes dentre as realizadas pelas centrais de reprodução equina no Brasil. Não só devido à aceitação das associações de criadores de cavalos, como também ao desenvolvimento de novas tecnologias permitindo com que o sêmen seja transportado da propriedade em que o garanhão se encontra até a propriedade em que a égua está alojada (SQUIRES et al, 1998). O fato de se transportar o sêmen até as éguas, ao invés de transportá-las até o garanhão oferece inúmeras vantagens, como a eliminação de gastos com transporte, a diminuição do estresse animal, a diminuição dos riscos impostos aos potros e as próprias matrizes de possíveis acidentes e de adquirir doenças, como resultado da exposição a patógenos em seu novo ambiente, além, destas propriedades serem, na grande maioria, distantes e dispenderem altos custos com a hospedagem dos animais (BRINSKO E VARNER, 1992).

O armazenamento de sêmen em baixas temperaturas tem como objetivo prolongar a viabilidade espermática por reduzir o consumo de energia e a formação de alguns subprodutos indesejáveis (ALTHOUSE et al, 1998). Entretanto, a taxa de fertilidade do sêmen refrigerado diminui à medida que aumenta o tempo de armazenamento (PICKETT, 1995), sendo a desnaturação da cromatina do espermatozoide um dos fatores que podem estar envolvidos na queda de fertilidade observada quando o sêmen é armazenado (WATSON, 2000). Além disso, durante o processo de redução de temperatura, ocorre reorganização nos lipídeos da membrana plasmática, o que acarreta diretamente na diminuição da longevidade dos espermatozoides. (HOLT, 2000).

Os fatores determinantes da diminuição do potencial fertilizante do sêmen refrigerado ou congelado de garanhões não são, em alguns casos, elucidados através dos tradicionais parâmetros espermáticos avaliados na rotina de uma clínica ou central de reprodução (LÓPEZ-FÉRNANDEZ et al, 2007). Parte dos baixos índices, muitas vezes atribuídos às fêmeas, tem origem na fragmentação do DNA espermático, que por não fazer parte dos exames andrológicos de rotina, não são detectados e/ou mensurados (D'OCCHIO et al, 2007).

Entre os parâmetros avaliados para se determinar as características de uma amostra de sêmen, a fragmentação do DNA espermático vem despertando grande interesse (GOSÁLVEZ et al, 2006). Em humanos, o estudo da fragmentação espermática tem ajudado a entender as causas de infertilidade em espermogramas considerados normais (SERGERIE et al, 2005).

Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido realizados nas diferentes espécies com o intuito de se determinar os fatores envolvidos no processo da fragmentação do DNA espermático. A biologia molecular voltada à área da reprodução tem resultado em inúmeras técnicas para a avaliação da qualidade da cromatina e determinação da fragmentação do DNA espermático, de modo a esclarecer e justificar os motivos de exames andrológicos aparentemente normais resultarem em índices de fertilidade baixos (SERGERIE et al, 2005).

Durante muitos anos a mortalidade embrionária nas espécies mamíferas foi atribuída a fatores relacionados com a infertilidade das fêmeas, no entanto, hoje já se tem evidências de que a qualidade ou “status” da cromatina espermática no momento da fertilização pode influenciar na sobrevivência embrionária (D’OCCHIO et al, 2007).

O processo de dano ou fragmentação do DNA espermático é, com certeza, de origem multifatorial, e apesar de ainda não estar bem definida, já se sabe que alguns acontecimentos como a presença de radicais livres de oxigênio, erros na correta substituição de histonas por protaminas na cromatina, e a ocorrência de apoptose celular são fatores estimuladores para que ocorra a fragmentação do DNA espermático (GOSÁLVEZ et al, 2006).

Em várias espécies de mamíferos foi observada uma correlação entre um alto índice de fragmentação do DNA espermático e uma baixa fertilidade (EVENSON et al, 1994). Além disso, a fertilização de um espermatozoide com o DNA fragmentado resulta em um desenvolvimento embrionário comprometido, aumentando a perda embrionária, resultando na queda das taxas de prenhez (HAMMADEH et al, 1998; EVENSON et al, 1999; HOST et al, 2000; LARSON et al, 2000; BENCHAIIB et al, 2003; HENKEL et al, 2004; SELI et al, 2004; VIRRO et al, 2004; MORRIS et al, 2002; WARD et al, 2000; ZINI et al, 2001). Em humanos, também foi observada uma correlação entre um alto índice de fragmentação do DNA espermático e a baixa fertilidade (EVENSON et al, 1994). Em estudo com a espécie equina, LOVE et. al. (2005) demonstraram que a qualidade da cromatina

pode decair mesmo com a manutenção de bons padrões de motilidade espermática.

O presente estudo foi desenvolvido a fim de elucidar, se cavalos da raça Mangalarga Marchador são mais sensíveis ao processo de refrigeração bem como determinar o seu efeito sobre a estabilidade da cromatina espermática.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

Os espermatozoides são células especializadas na transferência da informação genética, a partir da união dos gametas, para que haja a formação de um novo indivíduo (MORTIMER, 1997). Para que ocorra essa união, o espermatozoide deve manter condições básicas como metabolismo para a produção de energia, motilidade progressiva, integridade acrossomal e integridade do DNA para que ocorra a ligação com o gameta feminino e finalmente a fertilização (LOVE, 2005).

2.1. SÊMEN REFRIGERADO

Há muitos anos várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de prolongar a longevidade espermática através da refrigeração ou criopreservação do sêmen equino e com isso melhorar as taxas de fertilidade. Muitas dessas pesquisas têm como objetivo desenvolver diluidores, aditivos, curvas e protocolos de refrigeração, assim como tempos e temperaturas de estocagem que garantam a motilidade e integridade do sêmen equino submetido à refrigeração e com isso índices de fertilidade melhores e menos variáveis.

Nos últimos anos, houve um aumento considerável na utilização de sêmen equino refrigerado, principalmente devido à aceitação de grande parte das associações de criadores de cavalos. O uso desta técnica facilita muito o manejo reprodutivo nos haras, já que não há necessidade da presença da égua e do garanhão no mesmo local (SQUIRES et al, 1998).

A raça Mangalarga Marchador, de origem nacional, tem se mostrado extremamente sensível ao processo de manipulação, refrigeração e transporte de sêmen diferentemente de garanhões das raças Quarto de Milha, Brasileiro de Hipismo e outras de origem internacional (ALVARENGA, 2002).

Como em outras espécies de produção, o sucesso da inseminação artificial nos equinos depende da manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen durante o armazenamento (IJAZ E DUCHARME, 1995). Além disso, quanto maior o tempo ao qual se mantém o potencial fertilizante do sêmen refrigerado, maior flexibilidade terá o médico veterinário para coletar e enviar o sêmen aos haras em

que as éguas se encontram (PICKETT, 1992), resultando num maior êxito da técnica (BATELLIER et al., 2001).

Diluidores adequados, taxa de refrigeração lenta, temperatura de manutenção adequada, a minimização dos danos na membrana plasmática e o bloqueio da capacitação prematura do espermatozóide são alguns dos fatores diretamente ligados ao sucesso da preservação espermática pelo processo de refrigeração (LOOMIS, 1992). Entretanto, sabe-se que a taxa de fertilidade do sêmen refrigerado diminui à medida que aumenta o tempo de armazenamento (PICKETT, 1995).

O melhor intervalo de temperatura para a manutenção das células espermáticas esta entre 4 e 5°C (SQUIRES et al 1999), para que se chegue a estas temperaturas, é recomendado que o sêmen seja refrigerado rapidamente da temperatura de 35°C até 19°C, porém após esta etapa deve-se diminuir a curva de refrigeração a uma taxa de -0,05°C/min a fim de se evitar o “cold shock” (choque frio) devido alta sensibilidade do espermatozoide equino ao atingir temperaturas próximas a 8 e 9°C (KATILA et al, 1997). Esse processo se caracteriza por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou retrógrado), perda rápida de motilidade, danos ao acrossomo e membrana plasmática, redução de metabolismo e perda de componentes intracelulares (AMANN e GRAHAM, 1992).

Todos esses cuidados são necessários, pois a exposição do sêmen desprotegido a baixas temperaturas resulta em desarranjos morfológicos e bioquímicos que tornam os espermatozoides irreversivelmente imóveis e inférteis (WATSON, 1981) e quanto mais tempo o potencial fertilizante do sêmen refrigerado possa ser estendido, mais fácil será uso do sêmen transportado juntamente com o sucesso da técnica (BATELLIER, et al., 2001).

A conservação do sêmen em temperaturas superiores (15 a 20°C) também tem sido utilizada, sendo que nestas temperaturas o sêmen não deve ser armazenado por um período maior que 24 horas, pois ocorre queda de fertilidade (SQUIRES et al, 1999). No Brasil, a refrigeração do sêmen a temperatura entre 15 e 18°C é frequentemente utilizada, por necessitar de sistemas de armazenamento simples (ALVARENGA e CARMO, 2007).

No Brasil ALVARENGA et. al. (2003 e 2005) observaram que garanhões da raça Mangalarga Marchador, por fatores ainda não determinados, são mais

susceptíveis ao processo de congelação espermática quando comparado a outras raças. AMMAN e PICKETT (1987) destacam que, além dos fatores raciais, podem ser observadas grandes diferenças individuais dentro de uma mesma raça.

Apesar da grande difusão em relação ao uso do sêmen equino refrigerado, este ainda apresenta algumas limitações, sabe-se que há uma variação considerável nas taxas de fertilidade, que na medida em que o tempo de armazenamento aumenta, a fertilidade do sêmen diminui, e que para conseguir bons índices de fertilidade o sêmen não deve ser refrigerado por um período superior a 24 horas (PICKETT, 1995). Dentre os fatores que podem afetar essas taxas podemos ressaltar a fertilidade intrínseca do garanhão e da égua, a composição do diluente adicionado ao sêmen, a curva de refrigeração, a temperatura de armazenamento do sêmen diluído, a dose inseminante (quantidade total de espermatozoides móveis), a relação entre a inseminação e a proximidade da ovulação e o tempo de armazenamento in vitro. (PICKETT, 1995).

2.2. DILUIÇÃO E PLASMA SEMINAL

Existem garanhões que são mais sensíveis ao processo de refrigeração e congelação do sêmen, assim, para esses indivíduos, a retirada do plasma seminal através do processo de centrifugação pode ser benéfica (SQUIRES e BRINSKO, 1992).

Altas concentrações de plasma seminal são deletérias aos espermatozoides submetidos à refrigeração e armazenamento (BRINSKO et al., 2000), assim, a diluição do sêmen em meio apropriado, à base de leite desnatado, reduz esses efeitos negativos (PADILLA e FOOTE, 1991). Outras formas de diminuir esses efeitos seriam a coleta e diluição somente da fração rica em espermatozoides no ejaculado ou pelo uso de altas diluições com diluentes apropriados, sendo este o método o mais utilizado para refrigeração e transporte de sêmen (BRINSKO et al., 2000).

Os diluentes de sêmen são substâncias destinadas a proteger o espermatozoide de condições adversas e, conseqüentemente, prolongar sua vida (PICKETT e AMANN, 1987; BRINSKO e VARNER, 1992). São utilizados também

para aumentar a viabilidade do sêmen de animais subfêrteis (BLANCHARD et al., 1987), aumentar o volume da dose inseminante (PICKETT e AMANN, 1987) e auxiliar nas avaliações de amostras de sêmen (KENNEY et al., 1983).

Outra alternativa para reduzir as concentrações de plasma seminal do ejaculado é a centrifugação do sêmen. JASKO et al. (1991) demonstraram que a motilidade espermática do sêmen refrigerado equino pode ser melhorada após a centrifugação e remoção do plasma seminal. Em outro estudo, JASKO et al. (1992), verificaram que a centrifugação e a remoção parcial do plasma seminal antes do armazenamento a 5°C por 24 e 48 horas resultou em melhores resultados de motilidade do que amostras em que o plasma foi mantido.

PALMER et al., 1984, demonstraram que a taxa de sobrevivência dos espermatozoides em sêmen diluído apresentando 50%, 20%, 10% e 0% de plasma seminal, foi de 27,3%, 44,2%, 50,8% e 55,9%, respectivamente. VARNER et al. (1988) demonstraram que a diluição do sêmen equino a 25×10^6 spz/ml, com extensor contendo leite desnatado, apresentou maior manutenção da motilidade quando comparada a outras concentrações, como 50×10^6 spz/ml e 100×10^6 spz/ml. No entanto, uma vez que o sêmen foi muito diluído, observou-se redução nas taxas de fertilidade.

O diluidor mundialmente utilizado para a refrigeração é composto por leite em pó desnatado (KENNEY et al., 1975). CARVALHO et al. (2005) desenvolveram um estudo que avaliou a eficácia de diversos diluentes, com ou sem a adição do aminoácido taurina, sobre a viabilidade espermática do sêmen equino, a intervalos de 24 horas, durante 96 horas. Os resultados laboratoriais demonstraram que o diluente à base de glicina leite desnatado, acrescido do aminoácido taurina, apresentou resultados superiores dos parâmetros espermáticos e da fertilidade, quando comparado ao diluente à base de leite desnatado-glicose. FARRÁS et al. (2008), compararam diluentes à base de leite desnatado e outro contendo apenas frações purificadas de leite, sendo possível observar que todos os diluentes podem ser utilizados sem prejuízos para a motilidade e viabilidade espermáticas, tanto nas temperaturas de 5°C como de 15°C.

2.3. Sistemas de transporte e taxas de refrigeração

Para que se obtenha bons índices de fertilidade com o uso de sêmen refrigerado de garanhões, este deve ser acondicionado em recipientes especialmente desenvolvidos para este fim, os quais devem obedecer às curvas de refrigeração já determinadas como adequadas (SQUIRES e BRINSKO, 1997). A temperatura ideal de refrigeração do sêmen equino é de 5° C. No entanto, para determinados garanhões, temperaturas próximas a 15°C preservam melhor a motilidade espermática. Porém, é importante destacar que o sêmen preservado a 15°C apresenta redução na fertilidade se armazenado por um período de tempo superior a 24 horas (SQUIRES e BRINSKO, 1997).

O sêmen equino geralmente é transportado em dispositivos de refrigeração passiva. No mercado Internacional existe um container denominado Equitainer® que resfria a amostra de sêmen a uma taxa inicial de -0,03°C/min. (SQUIRES et al., 1998), propiciando uma curva adequada de temperatura até 5°C, permitindo manter o sêmen refrigerado por até 48 horas (SQUIRES 1999).

MACHADO et al., (2002) realizaram estudo cujo objetivo foi comparar o "Equine Express®" com outro método composto por um sistema de dois isopores sendo um dentro do outro cujas medidas são 15x11cm para o menor e 25x16cm para o maior, ambos os sistemas de refrigeração passiva, comprovando que este novo dispositivo realizou uma curva de refrigeração de -0,02°C/min., sendo eficaz na manutenção da temperatura (16°C por período superior a 24 horas) e da qualidade espermática por análise computadorizada (motilidade total e progressiva), bem como a integridade de membrana plasmática, demonstrando, assim, a eficiência desse sistema.

Nos casos em que a inseminação ocorrer até 12 horas após a colheita do sêmen, o mesmo pode ser armazenado tanto nas temperaturas de 20°C como de 5°C, sendo esta última preferencial à primeira (VARNER et al., 1988; KAYSER et al., 1992), além disso o intervalo entre 4-6°C é considerado o mais adequado para a manutenção da motilidade e da fertilidade (PALMER et al., 1984; SQUIRES et al., 1988), apresentando melhores resultados quanto a manutenção das células espermáticas que 0 ou 2°C (SQUIRES et al., 1999).

Recentemente, foram desenvolvidos no Brasil dois sistemas para transporte de sêmen equino, um a 15°C (Botubox®) e outro para transporte a 5°C (Botutainer®). O sistema Botutainer® se mostrou tão eficiente quanto o Equitainer® com relação à preservação da motilidade e à proteção das variações da temperatura externa (AVANZI et al, 2006; FARRÁS et al., 2008).

2.4. ESTRUTURA DO DNA ESPERMÁTICO

A espermatogênese nos mamíferos é um processo complexo e único que envolve mudanças fisiológicas, bioquímicas e morfológicas que transformam uma espermatogônia diploide em um espermatozoide haploide totalmente diferenciado, com núcleo condensado, acrossomo e flagelo (SENGER et al, 1999). No início desta fase, o DNA está associado às histonas em uma configuração clássica como a de qualquer outra célula somática (D'OCCHIO et al, 2007). Posteriormente, a forma e tamanho do núcleo e o grau de compactação da cromatina mudam drasticamente (DADOUNE 2003).

Concomitante às alterações visíveis na organização da cromatina dos espermatozoides, as histonas são removidas do DNA de espermatócitos e espermátides iniciais, sendo substituídas por proteínas de transição, que por sua vez são substituídas pelas protaminas (STEGER 1999; KIERSZENBAUM 2001; ZHAO et al, 2001). Estas interagem com o DNA de forma única, resultando no seu enrolamento em subunidades extremamente compactas em forma de solenoide, que são as responsáveis pela condensação final e estabilização da cromatina dos espermatozoides (BALHORN et al, 1999; D'OCCHIO et al, 2007). Após a conclusão da espermiogênese pode haver até 50.000 dessas estruturas, embaladas dentro do núcleo dos espermatozoides (BALHORN et al, 1999).

O nucleossomo é composto por DNA envolto em um octâmero de histonas (NOLL 1974). Cada nucleossomo está ligado à fita de DNA através de um "DNA-linker", adquirindo assim a forma de uma colar de contas (WOLFFE 2001). Através da microscopia eletrônica, foi mostrado que a organização da cromatina do nucleossomo em espermátides iniciais desaparece e é substituído por fibras lisas (DADOUNE 2003). A agregação dessas fibras dá origem a fibras maiores, que se aglutinam em uma densa massa homogênea resultante da interação do

DNA espermático com as protaminas (LOIR et al, 1985). Dessa forma a cromatina dos espermatozoides é organizada de forma diferente das células somáticas (HAAF e WARD, 1995; EVENSON et al, 2002).

2.4.1. Histonas

As histonas representam aproximadamente 20% das proteínas nucleares em espermatozoides humanos (DADOUNE 2003) e podem ser divididas em três categorias (MEISTRICH et al, 1989). As histonas somáticas: encontradas em células somáticas e nas células espermatogênicas do testículo. Variações de "células germinativas" presentes em células somáticas, e pouco encontradas em células espermáticas (MEISTRICH et al, 1989). E as histonas específicas dos testículos, encontrados somente em células espermáticas e testiculares (MEISTRICH et al, 1989).

A acetilação da porção terminal da cauda das histonas H4 reduz sua afinidade pela fita de DNA (McCARREY 1998), e conseqüentemente sua rigidez, tornando possível a interação com outras proteínas, o que resultará na substituição das histonas pelas proteínas de transição (MEISTRICH et al, 1992).

Por alguma falha no mecanismo de ação das protaminas, pode não ocorrer à correta substituição dessas histonas, resultando na formação de uma estrutura inadequada com uma cromatina instável (EVENSON et al, 1999).

2.4.2. Proteínas de Transição

As Proteínas de Transição são as mais encontradas nas espermátides durante o período de substituição das histonas pelas protaminas (MEISTRICH et al, 1989). Durante esta fase, pode-se dizer que ocorrem três importantes eventos: a reorganização da cromatina no nucleossomo, ordenando-as em fibras lisas; o início da condensação da cromatina; e o fim da fase de transição. Sugerindo assim que as proteínas de transição estão envolvidas em pelo menos um destes processos. (DADOUNE 2003).

Nas espécies mamíferas, encontram-se vários tipos de proteínas de transição, porém as proteínas 1 e 2 são encontradas em todas as espécies.

Acredita-se que estas realizam a função de alinhamento longitudinal do DNA (DADOUNE 2003), e que também estão ativamente envolvidas no processo de condensação nuclear, que transforma a cromatina somática na cromatina fibrilar dos espermatozoides maduros (LÉVESQUE et al, 1998).

A proteína de transição 1 tem a capacidade de desestabilizar e relaxar a fita de DNA, reduzindo sua interação com o nucleossomo (LÉVESQUE et al, 1998). Além disso, está envolvida no processo de reparação de quebras na fita do DNA (CARON et al, 2001). Já a proteína de transição 2 possui melhores propriedades de estabilização e condensação que as proteínas de transição 1, e estão envolvidas na iniciação da condensação da cromatina, antes mesmo da atuação das protaminas (LÉVESQUE et al, 1998).

2.4.3. Protaminas

Vários estudos têm demonstrado o envolvimento de dois tipos diferentes de protaminas na compactação dos espermatozoides, a P1, encontrada em todas as espécies mamíferas, e a P2, caracterizada como um precursor de proteínas, sendo encontrada em só algumas espécies de mamíferos (BALHORN et al, 1999).

Devido as diferentes proporções entre P1 e P2 encontradas nas diferentes espécies, existe uma dificuldade de se estabelecer como estas duas protaminas participam no processo de compactação do DNA espermático. Porém sabe-se também que há uma relação constante entre a soma (P1 + P2) das que estão associadas à fita de DNA. Podendo então, ser estabelecido um padrão sobre a quantidade total de protaminas e consequentemente ao comprimento de fita de DNA que está associado elas (BALHORN et al, 1999).

Através da microscopia eletrônica, se observou pela primeira vez que as protaminas ligadas à fita de DNA são as responsáveis pela organização da cromatina em forma de rosca, dando origem a uma estrutura única extremamente compactada e resistente ao processo de desnaturação (D'OCCHIO et al, 2007), demonstrando assim a importância do papel das protaminas e do seu correto funcionamento com relação à fertilidade masculina e consequentemente ao desenvolvimento embrionário.

2.5. FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO

A integridade do DNA espermático é essencial para a correta transmissão da informação genética. Sua estrutura é altamente compacta e complexa. Sendo assim, qualquer forma de anormalidades na cromatina ou danos ao DNA pode resultar em infertilidade masculina (AGARWAL e SAID, 2003).

Entre os parâmetros avaliados para se determinar as características de uma amostra de sêmen, a fragmentação do DNA espermático vem despertando grande interesse (GOSÁLVEZ et al, 2006). Em humanos, o estudo da fragmentação espermática tem ajudado a entender as causas de infertilidade em espermogramas considerados normais (SERGERIE et al, 2005). Em apoio a esta conclusão, foi relatado que a fertilidade *in vivo* diminui progressivamente quando se identifica mais de 30% dos espermatozoides com danos no DNA (AGARWAL e SAID, 2003).

O processo de dano ou fragmentação do DNA espermático é com certeza, de origem multifatorial, e apesar de ainda não estar bem definida, já se sabe que alguns acontecimentos são determinantes para que ocorra a fragmentação do DNA espermático (GOSÁLVEZ et al, 2006). Erros durante a compactação da cromatina, no processo de substituição de histonas por protaminas (GORCZYCA et al, 1993; SAILER et al, 1995; GOSÁLVEZ et al, 2006; DE AMBROGI et al, 2006), a presença de radicais livres de oxigênio (ROS) (KODAMA et al, 1997; SUN et al, 1997; AITKEN et al, 1998; LOPES et al, 1998; IRVINE et al, 2000; AITKEN e KRAUSZ, 2001; MOUSTAFA et al, 2004; GOSÁLVEZ et al, 2006; DE AMBROGI et al, 2006), e a ocorrência de apoptose celular (SAKKAS et al, 1999 e 2002; GOSÁLVEZ et al, 2006) são alguns dos fatores que influenciam na fragmentação do DNA espermático.

No início da espermatogênese o DNA está associado às histonas em uma configuração clássica como a de outra célula somática. Porém, com o decorrer da espermatogênese há uma substituição dessas histonas por protaminas. Este evento ocorre antes da saída do espermatozoide dos testículos. Já no epidídimo ocorre a formação de pontes de dissulfeto intra e intermoleculares nas protaminas, resultando em uma compactação e uma maior resistência do DNA à desnaturação. Dessa forma, a ocorrência de algumas falhas nesse procedimento

pode alterar as características das nucleoproteínas, resultando em uma cromatina susceptível ao processo de desnaturação (D'OCCHIO et al, 2007).

Em humanos tem-se atribuído alguns casos de infertilidade à diminuição no nível de protamina 2, causado pela persistência de histonas ou por alguma deficiência nos precursores da protamina 2 (DE YEBRA et al, 1998).

Em outro estudo, avaliando-se a relação de protaminas 1 e 2 (P1/P2), GARCÍA-PEIRÓ et al (2011) verificaram que a taxa de P1/P2 obteve correlação com o Índice de Fragmentação do DNA Espermático (sDFI) ($r=0,424$; $p=0,015$) e com o Índice de Fragmentação do DNA Espermático ao Longo do Tempo (rSDFI) ($r=0,525$; $p=0,002$) no momento após a descongelação, demonstrando, assim os indivíduos mais susceptíveis ao dano da cromatina espermática.

No plasma seminal existem algumas enzimas e moléculas com características antioxidantes (DE AMBROGI et al, 2006; BAUMBER e BALL 2000; AITKEN 2004), estas tem por função controlar a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), prevenindo assim a ocorrência de danos celulares, logo todo mecanismo que diminua a concentração destes antioxidantes, acarreta em um aumento na produção de ROS (BAUMBER e BALL 2000; AITKEN 2004) ocasionando o estresse oxidativo e um conseqüente aumento no dano celular. A maior causa do estresse oxidativo parece estar ligada às altas taxas de ROS associada com a retenção e excesso residual do citoplasma na peça intermediária (AITKEN e KRAUSZ, 2001).

BAUMBER et al (2002 e 2003) comprovaram que a incubação *in-vitro* da xanthine-xanthine oxidase (X-XO) resultou em um aumento dose-dependente na fragmentação do DNA espermático de equinos, que, por sua vez, foi neutralizada com a adição da substancia antioxidante catalase, mas não com a adição de “superóxido dismutase” (SOD) e “glutathiona peroxidase” (GSH), demonstrando certa eficácia na preservação da integridade do DNA. SERGERIE et al (2005) também demonstraram que a exposição artificial a ROS causou um aumento no dano do DNA espermático.

Existem duas características importantes no dano oxidativo que são relevantes para a etiologia da infertilidade masculina, primeiro, a ocorrência da catalisação da cascata da peroxidação por metais de transição, como ferro e cobre, encontrados no plasma seminal em quantidade suficiente para catalisar esta reação, a segunda é a presença de antioxidantes nas secreções do trato

reprodutivo, incluindo enzimas protetoras secretadas no espaço extracelular, como, por exemplo, a “glutathiona peroxidase” (GSH) e a “superóxido dismutase” (SOD), produzidos na cabeça e cauda do epidídimo, respectivamente, justificando o porquê de alguns homens considerados inférteis apresentarem uma atividade antioxidante deficitária nos ejaculados, resultando em uma correlação inversa com a fertilidade (SMITH et al, 1996).

A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) afeta a integridade das membranas dos espermatozoides, através da peroxidação lipídica e proteica, e leva a desnaturação da fita de DNA (MORTE et.al., 2008). Esse aumento de ROS pode desencadear efeitos indesejados na função espermática, sendo que o controle fisiológico da sua produção está ligado com eventos como a capacitação espermática, reação acrossomal, hiperativação e fusão do espermatozoide com o ovócito (BAUMBER et al., 2000; GADELLA et. al., 2001).

Em equinos, estudos demonstraram que os ROS atuam promovendo a peroxidação lipídica e que está associada com a diminuição da fertilidade (BAUMBER et al, 2000; BALL e VO, 2002). No processo de criopreservação ocorrem danos na membrana plasmática dos espermatozoides, resultando em um aumento do estresse oxidativo e formação de ROS, elevando os níveis basais de danos no DNA, que podem atingir até 50% após 6 horas de incubação a 37°C (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et. al, 2007), verificando também que as diferenças são mais marcantes quando o sêmen é incubado.

A ocorrência de apoptose celular é outro fator que parece ter influencia sob a fragmentação do DNA espermático. A “Fas” é uma proteína de membrana, que pertence ao grupo de fator de necrose tumoral, e que tem como função atuar como receptor do fator de crescimento e como mediador da apoptose celular (SUDA et al, 1993; KRAMMER et al, 1994; SCHULZE-OSTHOFF et al, 1994).

A apoptose nos espermatozoides, assim como nas células somáticas, ocorre como forma de eliminar células germinativas defeituosas (SAKKAS et al, 1999), assim, durante o processo da espermatogênese o mecanismo de verificação da célula germinativa, regido pelas células de Sertoli, é responsável pela indução de apoptose em 50% a 60% de todas as células germinativas que expressarem os marcadores apoptóticos “Fas”, resultando na sua fagocitose e consequente eliminação (BANERJEE et al, 1995).

No entanto, esse mecanismo pode não funcionar de forma eficiente, deixando que um percentual variável de células com defeito continue o processo de remodelação durante a espermiogênese, estando presente mais tarde no ejaculado. Com relação à falha do mecanismo de rastreamento, os resultados de um estudo de BURRELLO et al. (2004), sugerem que a qualidade do DNA e o remodelamento da célula espermática são eventos independentes, ou seja, a célula pode ter o núcleo corrompido e ainda sim resultar em um espermatozoide morfollogicamente normal. Logo, o fato de uma porcentagem variável de espermatozoides expressar marcadores apoptóticos, indica que este fenômeno poderia ser utilizado para selecionar os espermatozoides em amostras de sêmen (TESARIK et al, 1998).

Além dos fatores citados acima, existem outros que influenciam sobre a estrutura da cromatina espermática. KARABINUS et al (1997) demonstraram uma redução da estabilidade da cromatina espermática em touros expostos a estresse térmico por um período de 12 dias. Em contra partida, o mesmo autor verificou que células oriundas de sêmen de epidídimo são menos afetadas ao estresse causado pelo calor, demonstrando uma maior resistência à desnaturação devido à formação de pontes de dissulfeto e a condensação da cromatina que ocorrem normalmente durante o trânsito.

Em humanos, a inalação de toxinas, resultante do vício do tabagismo, como a nicotina, o monóxido de carbono, cádmio e outros mostraram aumentar os danos no DNA espermático (SUN et al, 1997), podendo este fato estar relacionado ao estresse oxidativo (SALEH et al, 2002), e além de causar injúrias à membrana plasmática, também induzir a altas frequências de quebra de DNA, tanto em fita simples com em fita dupla (AITKEN 1999).

2.5.1. Avaliação da Cromatina Espermática

A biologia molecular voltada à área da reprodução tem resultado em inúmeras técnicas para a avaliação da qualidade da cromatina espermática e para a determinação da fragmentação do DNA espermático (SERGERIE et al, 2005). Atualmente, existem basicamente duas estratégias para se estudar a fragmentação do DNA em amostras de sêmen, a primeira inclui as tecnologias

que medem a capacidade da cromatina e do DNA em sofrer desnaturação diante de vários tratamentos (técnicas: SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay); COMETA (Single-cell gel electrophoresis-SCGE); e o SCDtest (Teste de Dispersão da Cromatina Espermática)). A segunda estratégia inclui as técnicas que se utiliza de marcadores, incorporando moléculas nos locais de quebra do DNA, facilitando a sua determinação (Técnicas: TUNEL; e ISNT (In Situ Nick Translation) (GOSÁLVEZ et al, 2006)).

As técnicas mais utilizadas, atualmente para avaliar a integridade do DNA espermático são: SCSA, TUNEL e o COMETA (SCGE) (SERGERIE et al, 2005).

A SCSA desenvolvida por EVENSON et al (1980) é baseada na utilização da citometria de fluxo, juntamente com as propriedades metacromáticas da substância fluorescente “acridine orange”, a qual tem afinidade pela fita de DNA (LOVE 2005), possuindo uma utilização bastante difundida, principalmente, em seres humanos (GOSÁLVEZ et al, 2006), além de ser considerada a mais aceita pelos pesquisadores da área (LÓPEZ-FÉRNADEZ et al, 2008). O princípio básico desta técnica esta na susceptibilidade do DNA, intacto ou fragmentado, ser desnaturado, onde a cromatina que possui o DNA fragmentado será muito mais susceptível ao processo de desnaturação, sendo visualizado na cor verde em caso de DNA íntegro e vermelho quando fragmentado. Após estes procedimentos, as células são analisadas pelo Citômetro de Fluxo e são contabilizadas para que se mensure a fragmentação espermática (GOSÁLVEZ et al, 2006).

O teste TUNEL é baseado na técnica de introduzir nucleotídeos conhecidos modificados nos locais de quebra do DNA, através de uma reação enzimática com a “terminal deoxynucleotidyl transferase” (TdT) fazendo assim com que estes sejam visualizados. Estes nucleotídeos sofrem reações com anticorpos conjugados à sonda fluorescente, sendo mais tarde analisados por microscopia de fluorescência ou com uso do Citômetro de Fluxo (GOSÁLVEZ et al, 2006).

O teste COMETA é uma utilização específica da técnica de eletroforese. Desta forma, um núcleo fragmentado, que não contenha proteínas e esteja danificado, será movimentado com mais facilidade ao campo elétrico positivo, sendo que esta movimentação será proporcional ao tamanho dos fragmentos (GOSÁLVEZ et al, 2006), gerando uma imagem semelhante à cauda de um cometa. Os espermatozoides com DNA íntegro geram uma imagem discreta da

cauda (GOSÁLVEZ et al, 2006). Em humanos tem sido bastante útil para avaliar a integridade do DNA espermático e a qualidade do sêmen (IRVINE et al, 2000), bem como danos causados pelos processos de manipulação do sêmen, como os de criopreservação (STEELE et al, 2000).

DALZELL et al (2004) realizaram o primeiro estudo que avaliou os efeitos da incubação curta (4hr) e longa (24hr) a uma temperatura de 37°C sobre a integridade da cromatina espermática, resultados estes também observados por LÓPEZ-FÉRNANDEZ et al (2007), os quais demonstraram que as alterações no DNA foram evidenciadas após o período de incubação, e que a avaliação da fragmentação do DNA espermático antes e após incubação tem se mostrado de grande importância, levando a crer que este parâmetro deve ser analisado de forma ampla e não como um dado pontual e único.

Algumas das técnicas utilizadas para a determinação da fragmentação espermática são consideradas limitadas para uso rotineiro, por necessitarem de aparelhos de alto valor, ou por utilizarem enzimas cujo acesso ao DNA pode ser difícil e por serem métodos trabalhosos para um exame de rotina laboratorial (ENCISO et al, 2006).

2.5.1.1. SCD test (Sperm Chromatin Dispersion Test)

O SCDtest se baseia em produzir uma descondensação diferencial entre as cromatinas que se encontram fragmentadas das que se encontram intactas. Para isto realiza-se uma desproteínização e uma leve lise controlada, apresentando um grande halo de dispersão o espermatozoide que possui seu DNA fragmentado e se apresentando com pouco ou sem halo os espermatozoides com DNA íntegro. Esta avaliação deve ser feita em microscopia de fluorescência, o que valoriza a visualização dos halos formados, e é uma forma clara e fácil de diferenciar estas células e se determinar o Índice de Fragmentação do DNA Espermático (sDFI), expresso em porcentagem, contabilizando-se o número de células com halo e sem halo, em função da quantidade total de células contadas (GOSÁLVEZ et al, 2006). O SCDtest possui uma metodologia espécie-específica, que deve ser adaptada as espécies estudadas

para que se obtenha uma maior diferença visual entre os halos íntegros e danificados, facilitando a utilização da técnica (GOSÁLVEZ et al, 2006).

No Teste de Dispersão da Cromatina Espermática (SCDtest), visualizam-se dois morfonucleotipos diferentes: 1-) compacto ou com pequeno halo (DNA intacto); 2-) com largo ou moderado halo (DNA fragmentado), sendo necessário o uso de microscopia de fluorescência para a avaliação dos morfonucleotipos, nas diferentes espécies, com exceção da espécie humana, na qual é possível a visualização dos halos com a utilização de microscopia de campo claro.

2.5.2. Fragmentação *versus* Fertilidade e Perda Embrionária:

Por muitos anos se pensou que a mortalidade embrionária nas espécies mamíferas fosse resultante de fatores relacionados com a infertilidade feminina (D'OCCHIO et al, 2007). Atualmente têm-se importantes evidências que correlacionam à integridade da cromatina espermática, não só com a fertilização, mas também com o desenvolvimento embrionário (MORRIS et al, 2002; WARD et al, 2000; D'OCCHIO et al, 2007).

A avaliação da estrutura da cromatina espermática tem mostrado uma boa correlação com a fertilidade em diversas espécies como: touros (EVENSON et al, 1980; BALLACHEY et al, 1988; KARABINUS et al, 1990), humanos (EVENSON et al, 1999), ratos (EVENSON et.al., 1980) e garanhões (LOVE e KENNEY, 1998), onde espermatozoides de indivíduos com baixa fertilidade apresentam uma maior desnaturação da cromatina que os espermatozoides de machos de alta fertilidade (GILLAN et.al., 2005).

Em estudo com a espécie equina, LOVE (2005) demonstrou que a qualidade da cromatina pode decair mesmo com a manutenção de bons padrões de motilidade espermática. AHMADI e NG (1999) perceberam que ejaculados contendo espermatozoides com DNA comprometido, parecem ter a mesma capacidade de fertilizar oócitos quanto espermatozoides normais.

Em estudo, utilizando o SCSA para avaliação da qualidade da cromatina, com 89 casais humanos submetidos aos tratamentos reprodutivos de FIV e ICSI, LARSON-COOK et al (2006) verificaram que não houve gestação quando os índices de fragmentação foram maiores que 27%. Já BUNGUM et al (2004)

obtiveram melhores resultados na ICSI em relação à FIV utilizando o mesmo índice de fragmentação. Dessa forma, pode-se estabelecer importantes informações sobre os resultados negativos de gestação de homens com altos índices de fragmentação de DNA espermático.

DONELLY et al (2001) comparando sêmen fresco e congelado do mesmo ejaculado de homens considerados férteis e inférteis, relataram que no grupo de homens férteis, a estrutura do DNA não foi afetada pelo processo de criopreservação, totalmente oposto do grupo de homens inférteis, na qual teve um grau de dano de DNA significativo pelo processo de congelamento.

Em estudo humano, utilizando células espermáticas expostas a crescentes graus de estresse oxidativo, verificou-se que quando submetidos a baixos níveis de estresse oxidativo, a fragmentação do DNA espermático foi significativamente baixa, e as taxas de fusão espermatozoide–oócito foram aumentadas (AITKEN 1999). Com o aumento do estresse oxidativo, o mesmo autor verificou que o grau de dano no DNA aumentou significativamente e ainda nos níveis mais altos de estresse oxidativo, houve altíssimas taxas de fragmentação de DNA, juntamente com a diminuição da motilidade e capacidade de fusão com o oócitos.

Estes resultados vão de acordo com o estudo de AHMADI e NG (1999), que avaliaram a capacidade fertilizante de espermatozoides de “hamsters” com DNA danificado, pela exposição a diferentes graus de radiação gama, demonstrando assim, que os espermatozoides com DNA danificado possuem a capacidade de fertilizar o oócitos, porém o desenvolvimento embrionário se torna comprometido.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

- Determinar qual a melhor temperatura de armazenamento de sêmen refrigerado para as raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha.
- Determinar se existe diferença na taxa e na dinâmica da fragmentação do DNA entre as raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha.
- Determinar se existe diferença na taxa e na dinâmica da fragmentação do DNA entre as temperaturas de armazenamento de 5°C e 15°C.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente experimento avaliou e comparou a qualidade espermática de garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM) quanto a análise computadorizada de velocidade espermática, fragmentação do DNA espermático, integridade de membrana e morfologia espermática, armazenados em dois sistemas de transporte de sêmen refrigerado, 5 e 15°C.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados dois ejaculados de 27 garanhões (n=54 ejaculados), com idade entres 4 e 12 anos, sendo 11 da raça Mangalarga Marchador (MM) e outros 16 da raça Quarto de Milha (QM).

4.2 COLHEITA DOS EJACULADOS

A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial composta por um tubo rígido de PVC, mucosa de látex, mucosa plástica descartável e acoplada a um recipiente contendo uma camisa sanitária descartável. Foi empregada a metodologia da colheita fechada, com a temperatura da vagina artificial em torno de 45°C. Para que o garanhão efetuasse a monta, utilizou-se de uma égua no cio, devidamente contida, ou de manequim próprio para a monta de garanhões.

4.3. PROCESSAMENTO DO SÊMEN

Conforme organograma de execução (Figura 1), após a colheita dos ejaculados, estes foram filtrados, para que fosse descartada a fração gel, o volume mensurado em proveta graduada e uma alíquota foi separada para avaliação da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade espermática considerando-se uma trajetória retilínea (VSL), velocidade espermática real (VCL), linearidade (LIN), percentual de espermatozoides rápidos (RAPID) através da análise computadorizada (CASA - Hamilton Thorn – HTMIVOS 10 - *Anexo I*). A

integridade de membrana plasmática (Iodeto de Propídeo), integridade acrossomal (FITC-PSA) e potencial mitocondrial (JC-1) foi realizada segundo a metodologia descrita por CELEGUINI et al (2007).

A avaliação da concentração espermática foi determinada em microscópio de luz (200x) com auxílio de uma câmera de Neubauer após diluição de 10µL de sêmen em 190 µL de água destilada (1:20).

Após análise, o sêmen foi diluído em meio à base de leite desnatado (Botusemen®), em proporções que variaram de 2:1 a 5:1 a fim de se conseguir uma concentração de 50×10^6 sptz/mL e então se iniciou o processo de refrigeração em dispositivos de refrigeração do sêmen para as temperaturas de 5°C (Botutainer®) e 15°C (Botubox®).

As amostras foram armazenadas por um período de até 24 horas. As análises foram realizadas nos momentos 0, 12 e 24 horas de refrigeração, e quando submetidas ao Teste de Termo Resistencia (TTR), ao serem expostas a uma temperatura de 37°C por um período de 4 horas após a refrigeração de 12 e 24 horas, TTR12 e TTR24, respectivamente.

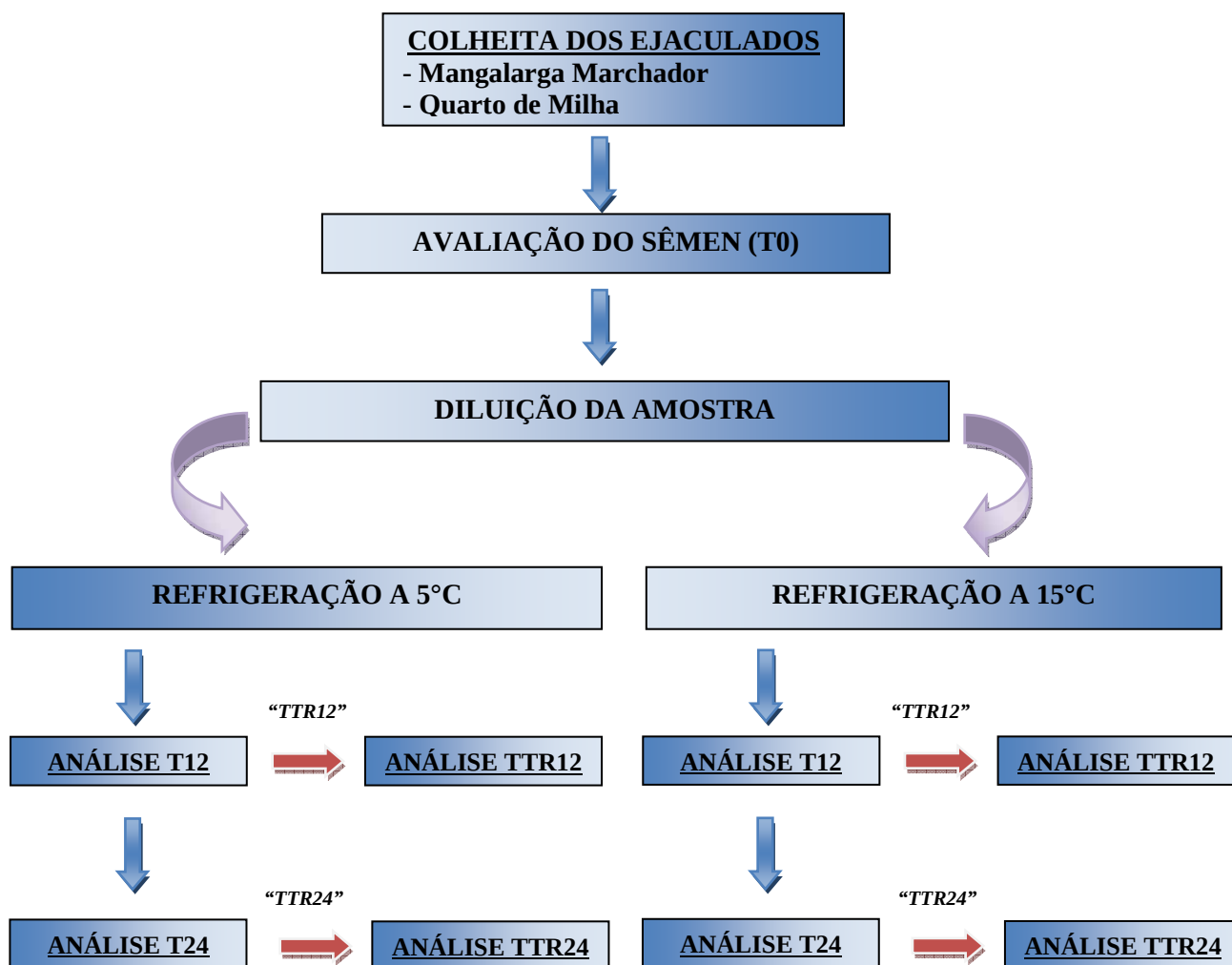


FIGURA 1: Organograma De Execução

4.4. AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DO DNA ESPERMÁTICO

As análises foram realizadas no momento 0 (T0), no sêmen refrigerado por 12 horas (T12), após 4 horas de incubado a 37°C (TT R12), por 24 horas (T24) e após 4 horas de incubado a 37°C (TTR24), onde foram avaliadas 200 células em cada momento. O período de 4 horas de incubação se justifica por ter sido este o momento de maior diferença na fragmentação de DNA entre indivíduos, segundo observado por LÓPEZ-FÉRNANDEZ et al (2007).

4.4.1. Teste de Dispersão de Cromatina Espermática (Halomax®).

Para determinação da fragmentação da cromatina, foi utilizado o kit comercial Halomax® (ChromaCell SL, Madrid, Espanha), específico para a espécie equina, baseado na técnica do Teste de Dispersão de Cromatina Espermática o qual resumidamente compreende as seguintes etapas: Adição do sêmen a uma solução de agarose, após isto uma alíquota (10 µl) da solução de agarose contendo os espermatozoides foi colocada sobre laminas pré-tratadas (fornecidas pelo produtor do kit, conforme Figura 2) as quais foram recobertas com lamínulas e então refrigeradas por 5 minutos. Após solidificação do gel a lamínula foi cuidadosamente removida e a solução gelatinosa contendo espermatozoides que permaneceu na lamina foi tratada com uma solução de lise (presente no Kit) por um período de 5 minutos. Sendo então lavada com água destilada durante 5 minutos e desidratada em concentrações crescentes de etanol (70 e 99%) durante um período de dois minutos cada.

Após o processo de desidratação e secagem as lâminas foram submetidas à coloração com a sonda fluorescente SyberGreen II (Sigma Aldrich) e avaliadas em microscópio de epifluorescência para determinação do percentual de células com DNA íntegro e lesado, onde foram avaliadas 200 células, sendo as que apresentaram um halo evidente com DNA fragmentado e as que se apresentaram com halo pouco evidente ao redor da cabeça com o DNA não fragmentado, conforme Figura 2.



Figura 2: a) Duas células espermáticas com DNA íntegro, presença de halo pequeno; b) Célula espermática com DNA fragmentado, com presença de halo;

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

A análise estatística dos dados do trabalho foi realizada pelo Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu.

Para cada variável avaliada, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de um delineamento em blocos, sendo cada animal considerado um bloco e os tratamentos no esquema fatorial com os fatores: raça, caixas térmicas, tempo de armazenamento e ejaculado.

A comparação entre as médias dos níveis de cada fator foi realizada pelo teste de Tukey, com nível de 5% de significância.

Para a análise da fragmentação do DNA espermático, foi utilizada a análise de sobrevivência (KAPLAN-MEIER) para verificar a sobrevivência da integridade do DNA espermático entre as raças e caixa térmica ao longo do tempo, sendo considerado nível de significância de 5%.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Ao se comparar somente as raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, independente dos sistemas e tempo de armazenamento observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) favorável à raça Quarto de Milha, para os parâmetros de motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), conforme descrito nas tabelas 1 e 2. Nas análises de velocidade espermática, também foi encontrado diferença ($p < 0,05$) para os parâmetros de VAP (Tabela 3) e RAPIDOS (Tabela 4). Com relação à integridade das membranas não foi encontrada diferença ($p > 0,05$) nas células espermáticas que apresentavam membrana plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial mitocondrial (PIAIA), conforme Tabela 5.

Na avaliação da fragmentação do DNA espermático, não foi observada diferença estatística entre as raças, tanto no sDF (Índice de Fragmentação do DNA Espermático) (Tabela 6) quanto na rSDF (Taxa de Fragmentação do DNA Espermático ao longo do tempo; sDF/hora) (Tabela 7), quando comparada análise de variância para avaliação estatística. Porém, ao se avaliar a dinâmica da fragmentação do DNA ao longo do tempo através do Teste de Sobrevivência de Kaplan-Meier, as raças se mostraram diferentes ($p < 0,05$), com superioridade para raça Quarto de Milha (Figura 4).

Os indivíduos dentro de uma mesma raça, não apresentaram diferença ($p > 0,05$) para os parâmetros de motilidade espermática, total e progressiva, assim como para as avaliações de outros parâmetros de velocidade VAP, VSL, VCL, STR, LIN, RAPIDOS e integridade de membrana PIAIA. Foi observado que houve diferença estatística entre os indivíduos ($p < 0,05$) quanto à fragmentação do DNA espermático (sDF) e para a taxa de fragmentação do DNA espermático (rSDF).

Os sistemas de armazenamento de sêmen refrigerado (5°C e 15°C), avaliados independentemente do fator raça, não demonstraram qualquer diferença em todos os parâmetros avaliados, conforme pode ser observado nas tabelas de 1 a 7.

Ao se avaliar somente o tempo em que o sêmen foi acondicionado nos dois sistemas de armazenamento, observou-se que a motilidade total (Tabela 1) e o percentual de espermatozoides rápidos (Tabela 4) apresentaram diferença em todos os momentos avaliados, ou seja, conforme esperado o sêmen no momento 0 apresentou melhores resultados que o sêmen armazenado por um período de

12 horas, que por sua vez se apresentou melhor que o acondicionado por um período de 24 horas. Os resultados das análises dos TTR, 12 e 24 (amostras de 12 e 24 horas acondicionadas a 37°C por um período de 4 horas), também se mostraram diferentes entre si ($p < 0,05$).

A motilidade progressiva (Tabela 2) e o VAP (Tabela 3) mostraram um mesmo comportamento com relação ao tempo. Em ambos os casos, o sêmen no momento 0 não mostrou diferença ($p > 0,05$) do sêmen refrigerado no momento 12 horas, porém foi diferente do refrigerado no momento 24 horas ($p < 0,05$). Em contra partida, o sêmen refrigerado por 12 horas não mostrou diferença do armazenado por 24 horas ($p > 0,05$). Os TTR 12 e 24 foram diferentes entre si ($p < 0,05$).

Quando da avaliação da integridade das membranas espermáticas, os subgrupos celulares PIAIB não apresentaram diferença ($p > 0,05$) em nenhum dos tempos avaliados, tanto quando armazenado nos sistemas térmicos, quanto durante os TTRs. Em contra partida as células PIAIA foram diferentes no sêmen fresco ($p < 0,05$) quando comparado ao sêmen armazenado por 12 e por 24 horas nos sistemas de armazenamento de sêmen refrigerado e também aos do TTR, que por sua vez não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Na análise da fragmentação do DNA espermático, o tempo de armazenamento não afetou o SDF (Tabela 6) ($p > 0,05$) do sêmen no momento 0 quando comparado ao refrigerado por 12 horas, que por sua vez também não foi diferente ($p > 0,05$) do armazenado por 24 horas, porém houve diferença ($p < 0,05$) ao se comparar o sêmen no momento 0 com o 24 horas de armazenamento. Os TTRs 12 e 24 foram diferentes entre si ($p < 0,05$). Na avaliação das rSDF, a velocidade de fragmentação durante os períodos de armazenamento 0-12, 12-24 e 0-24 horas não apresentaram diferença ($p > 0,05$). O mesmo aconteceu com relação aos TTRs 12 e 24 ($p > 0,05$). Porém, as amostras armazenadas a 5 e 15°C foram diferentes das expostas ao TTR ($p < 0,05$), ou seja a velocidade da fragmentação durante o período em que as amostras se encontravam a 37°C foi evidenciada quando comparada ao período de armazenamento às temperaturas de 5 e 15°C.

TABELA 1: Média e Desvio Padrão (%) da Motilidade Total (MT) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5°C e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO				
			0 ^a	12 ^b	TTR12 ^d	24 ^c	TTR24 ^e
MT	MM	5 ^A	75,00±12,08	65,17±18,86	7,67±9,34	55,72±24,18	2,67±6,83
		15 ^A	75,00±12,08	67,17±14,20	8,89±8,73	58,61±26,06	4,22±7,33
	QM	5 ^B	80,44±8,39	76,81±10,81	29,63±15,50	72,72±13,52	16,88±17,47
		15 ^B	80,44±8,39	76,97±11,82	26,25±15,80	73,22±14,54	14,34±15,97

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes.

Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Conforme demonstrado na Tabela 1, pode-se verificar diferença estatística ($p<0,05$), com superioridade da raça Quarto de Milha, no parâmetro de motilidade total. Quando comparados os tempos de armazenamento, foi observada diferença ($p<0,05$) do sêmen fresco contra os tempos 12 e 24 horas de refrigeração, e quando o mesmo foi submetido ao Teste de Termo Resistência (TTR12 e TTR24).

TABELA 2: Média e Desvio Padrão (%) da Motilidade Progressiva (MP) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5°C e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO				
			0 ^a	12 ^{ab}	TTR12 ^c	24 ^b	TTR24 ^d
MP	MM	5 ^A	32,50±11,21	28,72±14,93	3,28±4,79	25,00±18,64	1,28±3,66
		15 ^A	32,50±11,21	26,28±12,03	3,94±4,26	22,17±16,07	1,89±4,03
	QM	5 ^B	41,84±11,84	41,81±13,17	17,09±11,23	39,69±14,49	9,63±10,33
		15 ^B	41,84±11,84	38,81±13,92	13,41±11,76	34,47±14,35	7,72±9,09

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes.

Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Foi observada diferença estatística ($p<0,05$) na motilidade progressiva (MP) entre as raças estudadas, com superioridade para os animais da raça Quarto de Milha. Em relação aos tempos de armazenamento não houve diferença ($p>0,05$) entre o sêmen no momento 0 e o armazenado por 12 horas, e entre os tempos de 12 e 24 horas. Contudo, observou-se diferença estatística significativa ($p<0,05$) quando se realizou o Teste de Termo Resistência, conforme Tabela 2.

TABELA 3: Média e Desvio Padrão da velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), medida em $\mu\text{m/s}$ pelo HTMA, dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO				
			0 ^a	12 ^{ab}	TTR12 ^c	24 ^b	TTR24 ^d
VAP	MM	5 ^A	132,83±19,31	113,89±28,54	30,67±36,87	108,67±36,63	14,11±32,84
		15 ^A	132,83±19,31	121,00±22,89	44,67±37,53	106,78±39,21	20,17±34,12
	QM	5 ^B	130,06±19,51	127,02±12,27	87,44±33,43	115,29±19,82	52,74±45,83
		15 ^B	130,06±19,51	124,81±26,37	82,72±32,20	122,53±16,32	51,08±47,18

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes.

Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Quando avaliada a velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), medida em $\mu\text{m/s}$ pelo CASA, foi observada diferença ($p<0,05$) entre as raças. Em relação aos tempos de armazenamento, não houve diferença entre os momentos 0 e 12 horas e para os momentos 12 e 24 horas, e houve diferença ($p<0,05$) entre os momentos 12 e 24 horas com seus respectivos TTRs, TTR12 e TTR24, conforme pode ser observado na Tabela 3.

TABELA 4: Média e Desvio Padrão (%) do percentual de espermatozoides rápidos (RAPID) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO				
			0 ^a	12 ^b	TTR12 ^d	24 ^c	TTR24 ^e
RAPID	MM	5 ^A	66,94±13,76	55,78±24,22	3,94±5,30	45,50±23,80	1,89±5,16
		15 ^A	66,94±13,76	56,44±17,76	4,83±4,90	49,56±23,79	2,39±4,65
	QM	5 ^B	74,22±10,61	69,78±12,79	21,13±13,80	64,34±15,67	11,97±13,09
		15 ^B	74,22±10,61	69,13±14,93	18,22±14,41	64,44±17,21	10,19±11,78

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes.

Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Observou-se também, conforme demonstrado na Tabela 4, diferença estatística ($p<0,05$) no percentual de espermatozoides rápidos (RAP) entre as raças, com superioridade dos indivíduos da raça Quarto de Milha. Os tempos de armazenamento foram diferentes em todos os momentos avaliados ($p<0,05$).

TABELA 5: Média e Desvio Padrão (%) do percentual de espermatozoides que apresentam Membrana Plasmática Inteira, Acrossomo íntegro e Alto potencial mitocondrial (PIAIA) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO				
			0 ^a	12 ^b	TTR12 ^d	24 ^c	TTR24 ^d
PIAIA	MM	5 ^A	64,06±8,54	50,72±9,86	16,56±6,08	44,50±12,20	18,28±7,85
		15 ^A	64,06±8,54	51,78±8,91	17,50±6,47	42,06±12,20	16,56±7,25
	QM	5 ^A	57,69±13,13	49,56±12,55	28,66±12,41	43,91±12,40	27,91±16,30
		15 ^A	57,69±13,13	52,09±11,36	31,22±10,88	44,91±11,79	27,69±17,33

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes.

Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Conforme demonstrado na Tabela 5, não houve diferença estatística ($p>0,05$) na avaliação de integridade de membrana plasmática, potencial mitocondrial e integridade acrossomal para a variável PIAIA (Membrana Plasmática Inteira, Acrossomo íntegro e Alto potencial mitocondrial) entre as raças, assim como nos sistemas térmicos avaliados. Já os tempos de armazenamento foram diferentes ($p<0,05$) em todos os momentos avaliados.

TABELA 6: Média e Desvio Padrão (%) do Índice de Fragmentação do DNA Espermático (sDF) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO				
			0 ^d	12 ^{cd}	TTR12 ^b	24 ^c	TTR24 ^a
sDF	MM	5 ^A	11,78±4,66	12,95±4,18	24,06±20,23	14,11±4,89	29,11±20,30
		15 ^A	11,78±4,66	12,33±5,30	23,56±20,52	14,56±4,91	27,50±19,92
	QM	5 ^A	10,72±3,03	12,50±2,72	20,06±5,43	13,40±2,71	22,88±5,15
		15 ^A	10,72±3,03	12,03±2,55	20,88±5,06	13,19±3,58	21,63±6,33

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes.

Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

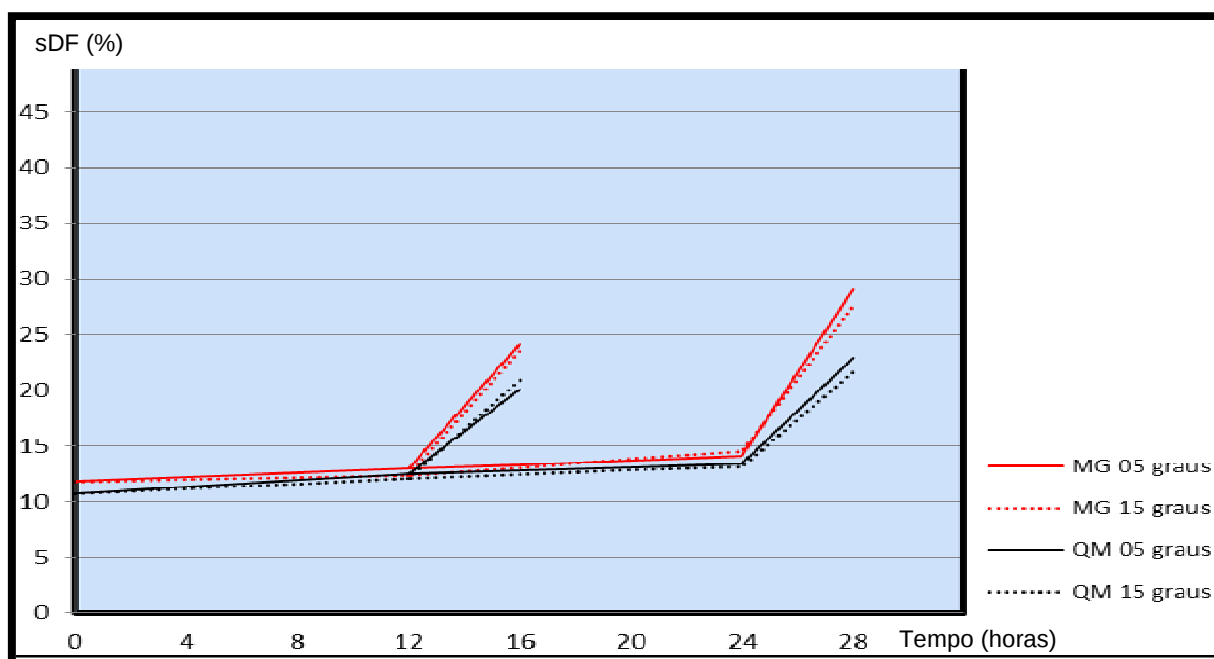


Figura 3. Dinâmica da fragmentação do DNA espermático do sêmen refrigerado, a 5°C e 15°C, e quando submetidos ao estresse térmico (37°C por um período de 4 horas), 16 (TTR12) e 28 (TTR24), de garanhões da raça Mangalarga (MG) e Quarto de Milha (QM) ao longo do tempo.

A Tabela 6, demonstra não ter sido observada diferença estatística ($p>0,05$) na avaliação do Índice de Fragmentação do DNA Espermático (sDF) entre as raças, assim como nos sistemas térmicos avaliados. Em relação aos tempos de armazenamento, não houve diferença ($p>0,05$) entre os tempos 0 e 12 horas e 12 e 24 horas. Contudo os TTRs também se mostraram diferentes ($p<0,05$).

TABELA 7: Média e Desvio Padrão da Velocidade de Fragmentação do DNA Espermático (rSDF), medido em % de Fragmentação/hora, dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO				
			0-12hr ^b	12-24hr ^b	0-24hr ^b	TTR (12-16hr) ^a	TTR (24-28hr) ^a
rSDF	MM	5 ^A	0,12±0,13	0,14±0,13	0,11±0,08	2,78±4,26	3,75±4,16
		15 ^A	0,08±0,12	0,2±0,25	0,12±0,09	2,81±3,94	3,24±4,10
	QM	5 ^A	0,17±0,16	0,13±0,11	0,12±0,10	1,89±1,24	2,37±1,15
		15 ^A	0,15±0,18	0,17±0,20	0,12±0,11	2,21±0,95	2,11±1,30

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes.

Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Não foi observada diferença estatística ($p>0,05$) na avaliação da Taxa de Fragmentação do DNA Espermático ($rSDF=sDF/hora$) entre as raças, assim como nos sistemas térmicos avaliados, conforme a tabela 7. Em relação aos tempos de armazenamento, houve diferença somente quando as amostras refrigeradas foram submetidas ao TTR.

Quando utilizado uma análise mais específica para avaliar a dinâmica da fragmentação do DNA espermático, denominada Teste de Sobrevivência de Kaplan-Meier, na qual é avaliada toda a dinâmica da fragmentação ao longo do tempo, foi possível observar diferença no comportamento das raças ($p<0,05$) e que não houve diferença entre os dois sistemas de armazenamento ($p>0,05$). Nesta avaliação, foi utilizado os dados durante os períodos de 0, 12, 24 horas e o TTR24, sendo o sêmen armazenado à temperatura de 5 e 15°C durante as primeiras 24 horas e após este período acondicionado por 4 horas a uma temperatura de 37°C (TTR24). A análise da dinâmica da fragmentação durante os momentos de 0, 12 e TTR12 não foi realizada através deste método por se tratar de poucos momentos para avaliação e dessa forma não fornecer um resultado confiável.

O teste de sobrevivência mostrou que não houve diferença significativa ($p>0,05$) com relação aos sistemas de armazenamento, tanto nos indivíduos da raça Mangalarga Marchador, quanto nos Quarto de Milha, assim como foi demonstrado na análise de variância (tabela 6).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O sucesso da preservação espermática, através da refrigeração está diretamente relacionado a fatores como: diluição, curva de refrigeração lenta e temperatura de armazenamento que reduza o metabolismo espermático minimizando os danos à membrana plasmática (LOOMIS, 1992).

SQUIRES e BRINSKO (1997) recomendam uma diluição do ejaculado a uma concentração de 25 e 50 x 10⁶ sptz/ml, principalmente pelo fator deletério do plasma seminal sobre a refrigeração e armazenamento do sêmen equino a 5° C. Além disso, altas concentrações de espermatozoides resultam em uma maior taxa de fragmentação do DNA, principalmente pela colisão entre as células espermáticas (LÓPEZ-FÉRNANDEZ et al 2010).

A utilização das biotecnologias do sêmen, tanto refrigerado como congelado, viabiliza o uso de um reprodutor em momentos nos quais não seria possível a monta natural, devido, principalmente às grandes distâncias encontradas entre o haras em que este se encontra e as propriedades das éguas (SQUIRES, 1998), além disso, com a grande procura do sêmen de alguns garanhões geneticamente superiores, podemos otimizar seu uso pela possibilidade de um ejaculado ser fracionado em varias doses, que podem ser enviadas a distintas regiões do país, além disso, preservamos a saúde destes garanhões, eliminamos os gastos inerentes ao transporte tanto do macho como da fêmea, diminuimos o estresse animal, os riscos do transporte de potros e matrizes de possíveis acidentes e adquirir novas doenças (BRINSKO e VARNER, 1992), e ainda aumentamos o número de animais a serem acasalados com um determinado reprodutor (GRAHAM, 1996).

Sabe-se que a capacidade fertilizante, usualmente é associada à qualidade da motilidade e a morfologia espermática (PARKS e GRAHAM, 1992; HOLT, 2000b), porém estas não possuem uma correlação absoluta, dessa forma, pode se dizer que o parâmetro da motilidade é menos preciso do que a real fertilidade das amostras de sêmen para se estimar a viabilidade espermática (CARVALHO & PAPA, 2003). Assim, buscando uma maior correlação entre as características de movimento e a capacidade fertilizante, JASKO et al. (1992) verificaram que a motilidade total, progressiva e velocidade média (VAP) podem predizer melhor

sobre a fertilidade, demonstrando a importância do uso da análise computadorizada para se obter uma maior acuidade às avaliações.

A análise da fragmentação do DNA também é um bom parâmetro para se prever a fertilidade (SERGERIE et al, 2005). Em humanos, foi observada uma alta correlação entre o índice de fragmentação do DNA espermático e a baixa fertilidade (EVENSON et al, 1994). Em estudo com a espécie equina, LOVE et. al. (2005) demonstraram que a qualidade da cromatina pode decair mesmo com a manutenção de bons padrões de motilidade espermática, justificando a importância da implantação desta análise para se realizar uma avaliação cada vez mais fidedigna quanto à fertilidade do garanhão.

O presente experimento teve por objetivo central avaliar, se cavalos da raça Mangalarga Marchador são mais sensíveis ao processo de refrigeração bem como determinar o efeito do processo de refrigeração de sêmen sobre a estabilidade da cromatina espermática nesta raça. Para determinação da fragmentação do DNA espermático foi utilizado a metodologia proposta por LÓPEZ-FÉRNANDEZ et al (2007) e Dalzell et al (2004), onde estes autores verificaram que as alterações da cromatina só se evidenciaram após a incubação das amostras a uma temperatura de 37°C e se utilizou o kit comercial Halomax® (ChromaCell SL, Madrid, Espanha). Este kit se mostrou tão eficiente quanto outras técnicas utilizadas rotineiramente para a avaliação da fragmentação do DNA, como o SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay), TUNEL (TdT-mediated-dUTP nick and labeling) e o COMETA (Single Cell Gel Eletroforesis - SCGE) (SERGERIE et al, 2005).

GOSÁLVEZ et al (2006) relataram outras vantagens da técnica do teste de dispersão da cromatina espermática, Halomax®, como o fato de não requerer mão de obra específica bem como aparelhagem de alto valor, como o Citômetro de fluxo. Podendo assim ser adaptada a qualquer laboratório de andrologia e ser introduzida nos exames andrológicos de rotina, além de não haver a necessidade de interpretação subjetiva de cor ou fluorescência.

Em nosso experimento os indivíduos da raça Mangalarga Marchador mostraram de uma forma geral maior sensibilidade ao processo de refrigeração quando comparado aos da raça Quarto de Milha tanto no armazenamento a 5°C, quanto no de 15°C, nos momentos 12 e 24 horas e também quando expostos ao TTR. Esta maior sensibilidade foi observada nos parâmetros de MT (Tabela 1),

MP (Tabela 2), VAP (Tabela 3), RAP (Tabela 4) e no teste de Sobrevivência da integridade do DNA espermático.

No parâmetro motilidade total foram observados valores de aproximadamente 77% para os QM e 67% para os garanhões da raça Mangalarga Marchador no período de 12 horas e de aproximadamente 73% *versus* 57% quando armazenado por 24 horas em ambos os sistemas de armazenamento, ou seja, do momento 0 para o 12 horas e do 12 para o 24 horas, houve uma queda de 10 pontos percentuais para os MM e 4 para os QM em ambos os períodos. A mesma diferença foi observada quando as amostras foram expostas aos TTRs, onde os animais da raça MM apresentaram uma MT de aproximadamente 8% no TTR12 e 4% no TTR24, contra 28% e 15%, respectivamente, dos garanhões da raça QM.

Apesar de a literatura ser omissa na comparação entre raças e sua relação com resistência à refrigeração de sêmen, uma maior sensibilidade dos garanhões da raça Mangalarga foi observada por ALVARENGA et al (2002) quando comparou sêmen submetido à congelamento de garanhões das raças MG, QM e HIPISMO. Este mesmo autor verificou que os indivíduos da raça MG foram os menos resistentes, onde somente 11,7% dos garanhões avaliados apresentaram uma MT maior que 40% após o processo de descongelamento, enquanto no grupo das raças QM e HIPISMO, 50 e 53,8% apresentaram uma MT maior que 40%.

Uma queda marcante na motilidade progressiva no sêmen refrigerado de cavalos da raça Mangalarga foi observada, conforme observado na Tabela 2. Concordando, assim com o estudo de ALVARENGA et al (2002), onde somente 5,8% dos garanhões obtiveram MP>20%, enquanto foi observado 41,6% dos cavalos da raça QM e 30,7% dos garanhões de Hipismo.

Além da MT e MP, nosso estudo demonstrou que a raça Mangalarga foi mais sensível ao processo de refrigeração do que a raça Quarto de Milha com relação às velocidades espermáticas e porcentagem de espermatozoides rápidos (Tabela 4).

LOVE (2005) demonstrou em estudo com equinos que os garanhões com pior fertilidade apresentaram uma motilidade total de 63% em média e índice de fragmentação do DNA de 25%, enquanto que no grupo em que a porcentagem de prenhez por ciclo foi elevada (82%), a motilidade total foi de 84% e a fragmentação do DNA foi de 12%.

Em relação à fragmentação do DNA espermático observamos uma divergência variável com a metodologia estatística empregada. Quando se avaliou através da análise de variância das médias e desvio padrão, não foi observado diferença tanto no sDF (Tabela 6) quanto da rSDF (Tabela 7) entre as raças, este resultado pode ser explicado pela grande variedade individual encontrada dentro de uma mesma raça e pela análise pontual da fragmentação do DNA. Porém a fragmentação do DNA espermático ocorre de forma dinâmica e deve ser avaliada como um conjunto dos pontos a serem analisados. Dessa forma, ao utilizarmos o Teste de Sobrevivência da Integridade do DNA, obtemos uma avaliação da dinâmica da fragmentação desde o momento 0 até o momento TTR24, com o qual foi possível detectar um maior índice de fragmentação nos indivíduos da raça Mangalarga quando comparado aos da raça Quarto de Milha.

Assim como no trabalho de LÓPEZ-FÉRNANDEZ et al (2007), na qual foi observada uma média na fragmentação do DNA espermático dos 23 garanhões estudados de 13,5% durante momento 0, ou seja, antes da refrigeração ou congelação destas amostras, nosso trabalho mostrou uma media de 11,78% e 10,72% para os indivíduos das raças MG e QM, respectivamente (Figura 3).

No presente trabalho, a fragmentação do DNA espermático no momento 0 não diferiu do momento 12, que por sua vez também não foi diferente do momento 24, sendo que apesar de haver diferença numérica (Tabela 6) entre os momentos 0 e 24, esta foi relativamente baixa. Esta mesma observação foi relatada por LÓPEZ-FÉRNANDEZ et al (2007), que verificou que a sDF nos momentos antes (13,5%) e pós-refrigeração (16,8%) ou congelação (14,2%) não diferiram e que esta diferença somente será evidenciada após a exposição a 37°C, o que também ocorreu em nosso trabalho, demonstrando ser necessário a indução do estresse térmico para a avaliação da estabilidade da cromatina (Figura 3).

Ao submetermos as amostras a um estresse térmico de 37°C por um período de 4 horas foi possível encontrar diferenças significativas com relação aos períodos de armazenamento nos sistemas térmicos, sendo que houve um aumento de, aproximadamente, 9 e 13 pontos percentuais, para as raças QM e MG respectivamente, durante os TTR 12 e 24. Estes resultados também corroboram os estudos de LÓPEZ-FÉRNANDEZ et al (2007), na qual houve um aumento na sDF dos garanhões quando expostos a 37°C, chegando, neste estudo

a um aumento de até 50% nas primeiras 6 horas de incubação e de até 100% após 48 horas de incubação.

As temperaturas de armazenamento, 5°C e 15°C, não apresentaram diferenças significativas entre si ($p>0,05$), para os parâmetros avaliados (MT, MP, VAP, RAP, PIAIA, sDF e rSDF) para todos os indivíduos tanto dos ganhos da raça Mangalarga quanto para os Quartos de Milha. Demonstrando que ambos os sistemas de armazenamento de sêmen são adequados para a manutenção das características da qualidade do sêmen, corroborando com os achados de MACHADO et al 2002, AVANZI et al 2006, FARRÁS et al 2008.

Alguns estudos demonstram que a manutenção da temperatura em torno de 5°C é preferencial a de 20°C (VARNER et al., 1988; KAYSER et al., 1992), ressaltando que o intervalo entre 4-6°C é o mais adequado para a manutenção da motilidade e da fertilidade (PALMER et al., 1984; SQUIRES et al., 1988).

AVANZI et al (2006) também não encontraram diferença entre os sistemas de armazenamento. Neste trabalho, foram comparados dois sistemas de refrigeração a 5°C e dois sistemas a 15°C, à temperatura ambiente e de 25°C. As características de motilidades total e progressiva, bem como a integridade de membrana não foram afetadas pela temperatura de armazenamento. Concordando com nossos achados, MACHADO et al., (2002) e FARRÁS et al (2008) também não encontraram diferença quando compararam os sistemas de armazenamento de sêmen a 5°C e 15°C.

Ao avaliarmos os indivíduos, dentro de uma mesma raça, não observamos diferença significativa ($p>0,05$), nos parâmetros de MT, MP, VAP, RAP e PIAIA, podendo assim afirmar que indivíduos escolhidos apresentavam parâmetros de qualidade seminal similar. Porém, quando se avaliou a sDF e a rSDF foi observada uma diferença individual, assim como demonstrado por LOVE 2005 ao relatar que este parâmetro é individual e pode se expressar mesmo com a manutenção de boas características espermáticas, além disso também observamos, assim como AMMAN e PICKETT (1987), que pode existir uma grande variação entre os parâmetros de indivíduos da mesma raça.

Estudos envolvendo a taxa de fragmentação do DNA ajudam a esclarecer e justificar os motivos de exames andrológicos aparentemente normais resultarem em índices de fertilidade aquém do esperado (SERGERIE et al, 2005), fato este já por muito tempo atribuído a fatores relacionados com a infertilidade das fêmeas,

no entanto, hoje já se sabe que qualidade ou status da cromatina espermática no momento da fertilização tem influencia direta na sobrevivência embrionária (D'OCCHIO et al, 2007).

Ao se avaliar os tempos de armazenamento do sêmen de um mesmo indivíduo no mesmo sistema térmico, podemos perceber que nos tempos de 0, 12 e 24 horas houve uma queda na qualidade da motilidade total e percentual de espermatozoides rápidos, discordando dos estudos de AVANZI et al (2006) e FARRÁS et al (2008) que não encontraram diferença durante os mesmos períodos avaliados. Já com relação à motilidade progressiva, ao VAP e a SDF, as 12 horas de armazenamento não prejudicou esses parâmetros quando comparados ao sêmen no momento 0, sendo que o mesmo aconteceu quando comparamos as 12 horas com 24 horas de armazenamento, ou seja não houve perda de qualidade, concordando com os resultados de MACHADO et al 2002, AVANZI et al 2006 e FARRÁS et al 2008 em relação à avaliação da movimentação espermática e com LÓPEZ-FÉRNANDEZ et al (2007), quanto a integridade da cromatina do espermatozoide.

Nosso estudo também verificou, assim como LÓPEZ-FÉRNANDEZ et al (2007) que a susceptibilidade à fragmentação do DNA espermático se evidencia após o estresse térmico, pois nos momentos de exposição ao TTR12 e TTR24, ou seja após 4 horas a 37°C a partir dos momentos 12 e 24 horas de refrigeração respectivamente, foi constatado um aumento na fragmentação do DNA para ambas as raças e sistemas térmicos. Este fenômeno também foi verificado na rSDF, onde não houve aumento durante os períodos de armazenamento a 5°C ou 15°C, ou seja 0-12hrs, 12-24hrs e no 0-24hrs, onde a velocidade de fragmentação do DNA espermático ocorreu de maneira muito suave, e que este foi evidenciado somente ao se expor as células em estresse térmico, nos momentos 12-16hrs e 24-28hrs, concordando com os achados de LÓPEZ-FÉRNANDEZ et al (2007). Contudo, nenhum trabalho se preocupou em relacionar a estabilidade da cromatina após o estresse térmico com fertilidade na espécie equina.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados e nas condições em que o experimento foi realizado, podemos concluir que:

- Os sistemas térmicos de armazenamento de sêmen refrigerado equino a 5°C e 15°C são eficientes tanto na manutenção das características de motilidade e integridade de membrana, bem como no dano da cromatina dos espermatozoides, e se comportam de maneira similar.
- A raça Mangalarga Marchador apresentou uma maior susceptibilidade de desestabilização da cromatina espermática após refrigeração do sêmen quando comparada à raça Quarto de Milha.
- A susceptibilidade à desnaturação da cromatina foi evidenciada quando os espermatozoides foram expostos ao estresse calórico.
- A raça Quarto de Milha apresentou melhor qualidade de motilidade espermática (MT, MP, VAP, RAPIDOS) quando comparada à raça Mangalarga Marchador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal, A. and Said, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction Update**, v.9, n.4, p.331-345, 2003.

Ahmadi, A. and Ng, S-C. Fertilizing ability of DNA damaged spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v.284, p.696-704, 1999.

Aitken, R. J., Gordon, E. Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennings, Z., and Irvine, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1037-1046, 1998.

Aitken, R. J. The Amoroso lecture. The human spermatozoon - a cell in crisis? **Journal of Reproduction and Fertility**, v.115, p.1-7, 1999.

Aitken, R. J. and Krausz, C. G. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p.497-506, 2001.

Aitken, R. J. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.655-664, 2004

Althouse, G. C., Wilson, M.E., Kuster, C., Parsley, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. **Theriogenology**, v.50, p.535-546, 1998.

Alvarenga, M.A. **Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões**. Botucatu, 2003. Tese (Livredocência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Alvarenga, M. A.; Papa, F. O.; Landim-Alvarenga, F. C.; Medeiros, A. S. L. Amides as cryoprotectants freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.

Alvarenga, M. A.; Carmo, M. T. Biotecnologia em reprodução equina: O que há de novo para o veterinário de campo? **Brazilian Journal of Equine Medicine**, v.14, p.26-30, 2007.

Amann, R. P.; Pickett, B. W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

Amann, D. P. & Graham, J.K. Spermatozoal function. In: Mc Kinnon, A.O.; Voss, J.L. (Eds). **Equine Reproduction**, Philadelphia: Lea & Febiger, p.715-745, 1992.

Avanzi, B. R.; Farrás, M. C.; Melo, C. M.; Alvarenga, M. A.; Dell'aqua Jr, J. A.; Medeiros, A. S. L.; Araújo, G. H. M.; Papa, F. O. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 152-154, 2006.

Balhorn, R., Cosman, M., Thornton, K., Krishnan, V.V., Corzett, M., Bench, G., Kramer, C., Lee, J., Hud, N.V., Allen, M., Prieto, M., Meyer-Ilse, W., Brown, J.T., Kirz, J., Zhang, X., Bradbury, E.M., Maki, G., Braun, R.E., Breed, W. Protamine mediated condensation of DNA in mammalian sperm. In: Gagnon, C., Ed.1, **The Male Gamete: From Basic Knowledge to Clinical Applications**. Illinois: Cache River Press, p.55-70, 1999.

Ball, B. A.; Vo, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY^{581/591}, **Journal of Andrology**, v. 23, n. 2, p. 259-269, 2002.

Ballachey, B. E.; Evenson, D. P.; Saacke, R. G. The sperm chromatin structure assay. Relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. **Journal of Andrology**. v. 9, p. 109-15, 1988.

Banerjee, S., Smallwood, A., Hulten, M. ATP-dependent reorganization of human sperm nuclear chromatin. **Journal of Cell Science** , v.108, p755-765, 1995.

Batellier, F.; Vidament, M.; Fauquant, J.; Duchamp, G.; Arnaud, G.; Yvon, J.M.; Magistrini, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.

Baumber, J.; Ball, B. A.; Gravance, C. G.; Medina, V.; Davies-Morel, M. C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 895-902, 2000.

Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., Meyers, S. A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote deoxyribonucleic acid (DNA) damage in equine sperm. **Theriogenology**, v.58, p.301-302, 2002.

Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., Meyers, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**. v.24, p.621-628, 2003.

Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H., Guerin, J.F. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. **Human Reproduction**, v.18, p.1023-1028, 2003.

Bianchi, P.G., Manicardi, G.C., Bizzaro, D., Bianchi, U., Sakkas, D. Effect of DNA protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.49, p.1038-1043, 1993.

Blanchard, T. L.; Varner, D. D.; Love, C. C.; Hurtgen, J. P.; Cummings, M. R.; Kenney, R. M. Use of a semen extender containing antibiotic to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Theriogenology**, v.28, n.4, p.541-545, 1987.

Brinsko, S. P. & Varner, D. D. Artificial insemination and preservation of semen. In Blanchar, T.L.; Varner, D.D. Stallion management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.8, n.1, p.205-218, 1992.

Brinsko, S. P., Crockett, E. C., Squires, E. L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, p.129-136, 2000.

Bungum, M., Humaidan, P., Spanó, M., Jepson, K., Bungum, L., Giwercman, A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. **Human Reproduction**, v.19, n.6, p. 1401-1408, 2004.

Burrello, N., Arcidiacono, G., Vicari, E., Asero, P., Di, B.D., De, P.A. Morphologically normal spermatozoa of patients with secretory oligo-asthenoteratozoospermia have an increased aneuploidy rate **Human Reproduction**, v.19, p.2298-2302, 2003.

Caron, N., Veilleux, S., Boissonneault, G. Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.437–443, 2001.

Carvalho, G. A.; Papa, F. O. Estudo de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermática utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 332-334, 2003.

Carvalho, G. A.; Zahn, F. S.; Melo, C. M.; Alvarenga, M. A.; Dell'Aqua Jr., J. A.; Papa, F. O. Effects of different extenders on sperm parameters and fertility of equine cooled semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p.275-277, 2005.

Chohan, K.R., Griffin, J.T., Lafromboise, M., De Jonge, C.J., Carrell, D.T. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. **Journal of Andrology**, v.27, p.53-59, 2006.

Dadoune, J.P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Microscopy Research and Technique**, v.61, p.56–75, 2003.

Dalzell, L. H., McVicar, C. M., Lutton, D., Lewis, S. E. M. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. **Fertility and Sterility**, v.82, n.5, p.1443-1445, 2004.

De Ambrogi, M., Spinaci, M., Galeati, G., Tamanini, C. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.66, p.1994-2000, 2006.

de Yebra, L., Balleca, J.L., Vanrell, J.A., Corzett, M., Balhorn, R., Oliva, R. Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine 2 levels. **Fertility and Sterility**, v.69, p.755–759, 1998.

D'occhio, M., Hengsberger, K.; Jonhston, S. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science**, v.101, p.1-17, 2007.

Donnelly, E.T., Steele, E.K., McClure, N., Lewis, S.E. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. **Human Reproduction**, v.16, p.1191-1199, 2001.

Duran, E.H., Gurgan, T., Gunalp, S., Enginsu, M.E., Yarali, H., Ayhan, A.. A logistic regression model including DNA status and morphology of spermatozoa for prediction of fertilisation in vitro. **Human Reproduction**, v.13, p.1235–1239, 1998.

Enciso, M., López-Fernandez, C., Fernandez, J.L., Garcia, P., Gosálbez, A., Gosálvez, J. A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. **Theriogenology**, v.65, p.308-316, 2006.

England, G. C. W., The normal Stallion. In: **Fertility & Obstetrics in the Horse**, Ed.3, Blackwell editora, cap.25, p.200-211, 2005.

Evenson, D. P.; Darzynkiewicz, Z.; Melamed, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**. p. 1131-1133, 1980.

Evenson, D.P., Jost, L.K., Baer, R.K., Turner, T., Schrader, S. Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. **Reproductive Toxicology**, v.5, p.115–125, 1991.

Evenson, D.P., Thompson, L., Jost, L. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. **Theriogenology**, v.41, p.637-651, 1994.

Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P., Claussen, O.P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v.14, p.1039–1049, 1999.

Evenson, D.P. and Jost, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v.22, p.169–189, 2000.

Evenson, D.P., Larson, K.J., Jost, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v.23, p.25-43, 2002.

Farrás, M. C.; Avanzi, B. R.; Melo, C. M.; Dell'Aqua, J. A.; Papa, F. O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen eqüino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, pg693-699, 2008.

Fernandez, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. **Fertility and Sterility**, v.84, p.833-842, 2005.

Gadella, B. M.; Rathi, R.; Brouwers, J. F.; Stout, T. A.; Colenbrander, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 249-65, 2001.

García-Peiró, A. B. S.; Martínez-Heredia, J.; Loiver-Bonet, M.; Abad, C; Amenqual, M. J.; Navarro, J.; Jones, C. B. S.; Coward, K.; Gosálvez, J.; Benet, J. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. **Fertility and Sterility**, v. 95, n.1, p.105-109, 2011.

Gillan, L.; Evans, G.; Maxwell, W. M. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, p. 445-57, 2005.

Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., Darzynkiewicz, Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. **Experimental Cell Research**, v.207, p.202-205, 1993.

Gosalvez, J., Fernandez, J.L., Goyanes, V., López-Fernandez, C. Análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD). **Biotechnology**. v.1, p.38-51, 2006.

Haaf, T. and Ward, D.C. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridisation and extended chromatin fibres. **Experimental Cell Research**, v. 219, p.604–611, 1995.

Hammadeh, M.E., Stieber, M., Haidl, G., Schmidt, W. Association between sperm cell chromatin condensation, morphology based on strict criteria, and fertilization, cleavage and pregnancy rates in an IVF program. **Andrologia**, v.30, p.29–35, 1998.

Henkel, R., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Gips, H., Schill, W.B., Kruger, T.F. Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. **Fertility and Sterility**, v.81, p.965-972, 2004.

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

Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p.3-22, 2000b.

Host, E., Lindenberg, S., Smidt-Jensen, S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v.79, p.559-563, 2000.

Ijaz, A.; Ducharme, R. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C. **Theriogenology**, v.44, p.1039-1050, 1995.

Irvine, D.S., Twigg, J.P., Gordon, E.L., Fulton, N., Milne, P.A., Aitken, R.J. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. **Journal of Andrology**, v.21, p.33–44, 2000.

Jasko, D. J.; Moran, D. M.; Farlin, M. E.; Squires, E. L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35, p.1059-1068, 1991.

Jasko, D.J.; Hathaway, J.A.; Schaltenbrand, V.L.; Simper, W.D.; Squires, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, p. 1241-1252, 1992.

Jasko, J.; Little, T. V.; Lein, D. H.; Foote, R. H. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987–1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, p. 979-985, 1992.

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

Karabinus, D. S.; Evenson, D. P.; Jost, L. K.; Baer, R. K.; Kaproth, M. T. Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. **Journal of Dairy Science**. v. 73, p. 2364-71, 1990.

Karabinus, D. S., Vogler, C. J., Saacke, R. G., Evenson, D. P. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology**, v.18, p.549–555, 1997.

Kayser, J. P.; Amann, R. P.; Shideler, E. L.; Jasko, D. J.; Pickett, B. W. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601-614, 1992.

Kenney, R. M.; Bergman, R. V.; Cooper, W. L.; Morse, G. W. Minimal contamination technique for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: Annual Convention Of The American Association Of Equine Practitioners, 21., 1975. **Proceedings...** 1975. p. 327-336.

Kenney, R. M.; Hurtgen, J.; Pierson, R.; Witherspoon, D.; Simons, J. Manual for clinical fertility evaluation of the stallion. Hastings – E.U.A., **Society of Theriogenology**, 1983.

Kierszenbaum, A.L. Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.357–358, 2001.

Kodama, H., Yamaguchi, R., Fukuda, J., Kasai, H., Tanaka, T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. **Fertility and Sterility**, v.68, p.519-524, 1997

Krammer, P.H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J. and Debatin, K.M. Regulation of apoptosis in the immune system. **Current Opinions in Immunology**, v.6, p.279–289, 1994.

Larson, K.L., DeJonge, C.J., Barnes, A.M., Jost, L.K., Evenson, D.P. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. **Human Reproduction**, v.15, p.1717– 1722, 2000.

Larson-Cook, K.L., Brannian, J.D., Hansen, K.A., Kasperson, K.M., Aamold, E.T., Evenson, D.P. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. **Fertility and Sterility**, v.80, p.895-902, 2003.

L'évesque, D., Veilleux, S., Caron, N., Boissonneault, G. Architectural DNA binding properties of the transition proteins 1 and 2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.252, n.3, p.602–609, 1998.

Loomis, P. R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: Annual Convention Of American Association Of Equine Practitioners, 38., 1992. **Proceedings...**, 1992. p.629-647.

Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J.G., Casper, R.F. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.13, p.896-900, 1998.

López-Fernandez, C., Crespo, F., Arroyo, F., Fernandez, J.L., Arana, P., Johnston, S.D., Gosálvez, J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion. **Theriogenology**, v.68, p.1240-1250, 2007.

López-Fernandez, C., Perez-Lhano, B., Garcia-Casado, P., Sala, R., Gosálbez, A., Arroyo, F., Fernandez, J.L., Gosálvez, J. Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. **Animal Reproduction Science**. v.103, p.87-98, 2008.

López-Fernández, C., S.D. Johnston, J.L. Fernández, R.J. Wilson, J. Gosálvez. Fragmentation dynamics of frozen-thawed ram sperm DNA is modulated by sperm concentration. **Theriogenology**, v.74, p.1362-1370, 2010.

Love, C. C.; Kenney, R. M. the relationship of increased susceptibility of sperm dna to denaturation and fertility in the stallion. **Theriogenology**, v. 50, p. 955-72, 1998.

Love, C. C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**. v.89, p.39–45, 2005.

Machado, M. S.; Leão, K. M.; Gomes, G. M.; Macedo, L. P.; Alvarenga, M. A. Efeitos de diferentes sistemas de transporte sobre a qualidade do sêmen refrigerado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.194-196, 2002.

Meistrich, M. L. Histones and basic nuclear protein transitions in mammalian spermatogenesis. In: Hnilica, L.S., Stein, G.S., Stein, J.L. (Eds.), **Histones and Other Basic Nuclear Proteins**. Boca Raton, Florida, CRC Press, p.165–182, 1989.

Meistrich, M.L., Trostle-Weige, P.K., Lin, R., Bhatnagar, Y.M., Allis, C.D. Highly acetylated H4 is associated with histone displacement in rat spermatids. **Molecular Reproduction and Development**, v.31, p.170–181, 1992.

McCarrey, J.R. Spermatogenesis as a model system for developmental analysis of regulatory mechanisms associated with tissue-specific gene expression. **Cell & Development Biology**, v.9, p.459–466, 1998.

McPherson, S., Longo, F.J. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. **European Journal of Histochemistry**, v.37, p.109–128, 1993.

Morris, I.D., Illott, S., Dixon, L., Brison, D.R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by singlecell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilisation and embryo development. **Human Reproduction**, v.17, p.990–998, 2002.

Moustafa, M.H., Sharma, R.K., Thornton, J., Mascha, E., Abdel-Hafez, M.A., Thomas, A.J., Agarwal, A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. **Human Reproduction**, v.19, p.129-138, 2004.

Morte, M. I; Rodrigues, A. M.; Soares, D.; Rodrigues, A. S.; Gamboa, S.; Ramalho-Santos, J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: Seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 106, p. 36-47, 2008

Mortimer, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Hum. Reprod. Update**, 3, 403–439, 1997.

Nichi, M.; Goovaerts, I. G.; Cortada, C. N.; Barnabe, V. H.; De Clercq, J. B.; Bols, P. E. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. **Theriogenology**, v. 67, p. 334-40, 2007

Noll, M. Internal structure of chromatin subunit. **Nucleic Acids Research**, v.1, n.11, p.1573-1578, 1974.

Padilla, A. W. & Foote, R. H. Extenders and centrifugation on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.69, p. 3308-3313, 1991.

Palmer, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. **Proceeding of the 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination 3**, 1984, p.377-379.

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

Parks, J., Graham, J. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.

Pickett, B. W. & Amann, R. P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, n.5, p. 289-302, 1987.

Pickett, B. W. The stallion: Retrospective analysis and opinions. **Biology Reproduction (Mono 1)**, p.547-564, 1995.

Squires, E.L.; Amann, R.P.; Mckinnon, A.O.; Pickett, B.W. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5oC or 20oC. In: International Congress In Animal Reproduction And Artificial Insemination, 11., 1988, Dublin. **Proceedings...** Dublin, 1988. p.297-299.

Squires, E. L. & Brinsko, S. P. Factors affecting fertility of cooled semen. In: Annual Meeting Of Equine Nutrition And Physiology Society, 1997, Fort Worth. **Proceedings...**Colorado State University, 1997. p.4-9.

Squires, E. L., Brubaker, J. K., Mccue, P. M., Pickett, B. W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. **Theriogenology**, v.28, p.709-718, 1998.

Squires, E. L.; Pickett, B. W.; Graham, J. K.; Vanderwall, D. K.; Mccue, P. M.; Bruemmer, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences – Colorado State University, Bulletin nº9, 1999.

Sailer, B. L., Jost, L. K., Evenson, D. P. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay (TDTA). **Journal of Andrology**, v.16, p.80–87, 1995.

Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P. G., Bianchi, U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. **Reviews of Reproduction**, v.4, p.31-37, 1999.

Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G. C., Mariethoz, E., Tarozzi, N., Bizzaro, D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.66, p.1061–1067, 2002.

Saleh, R. A., Agarwal, A., Sharma, R. K., Nelson, D. R., Thomas, A. J. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. **Fertility and Sterility**, v.78, p.491–499, 2002.

Sanocka, D.; Kurpysz, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproduction Biology and Endocrinology**, 2004.

Schulze-Osthoff, K., Walczak, H., Droge, W. and Krammer, P. H. Cell nucleus and DNA fragmentation are not required for apoptosis. **Journal of Cell Biology**, v.127, p.15–20, 1994.

Seli, E., Gardner, D. K., Schoolcraft, W. B., Moffatt, O., Sakkas, D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, v.82, p.378–383, 2004.

Senger, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. Ed.1, Washington, Current Conceptions Inc., 1999.

Sergerie, M., Laforest, G., Bujan, L., Bissonnette, F., Bleau, G. Sperm DNA fragmentation: threshold value in male fertility. **Human Reproduction** v.20, p.3446-3451, 2005.

Smith, R., Vantman, D., Ponce, J., Escobar, J., Lissi, E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. **Human Reproduction**, v.11, n.8, p.1655-1660, 1996.

Steele, E.K., McClure, N., Lewis, S.E. Comparison of the effects of two methods of cryopreservation on testicular sperm DNA. **Fertility and Sterility**, v.74, p.450-453, 2000.

Steger, K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. **Anat Embryol**, v.199, p.471–487, 1999.

Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. and Nagata, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell**, v.75, p.1169–1178, 1993.

Sun, J., Juirisicova, A., Casper, R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v.56, p.602–607, 1997.

Tesarik, J., Greco, E., Cohen-Bacrie, P., Mendoza, C. Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. **Molecular Human Reproduction**, vol.4, n.8, p.757–762, 1998.

Varner, D. D.; Blanchard, T. L.; Love, C. L.; Garcia, M. C.; Kenney, R. M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoa motility parameters. **Theriogenology**, v.29, p.1043-1054, 1988.

Virro, M. R., Larson-Cook, K. L., Evenson, D. P. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. **Fertility and Sterility**, v.81, p.1289-1295, 2004.

Ward, W. S., Kishikawa, H., Akutsu, H., Yanagimachi, H., Yanagimachi, R. Further evidence that sperm nuclear proteins are necessary for embryogenesis. **Zygote**, v.8, p.51–56, 2000.

Watson, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris, G. J. E., Clarke, A. (eds.). **Effects of low temperatures on biological membranes**. New York, p.189-218, 1981.

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

Wolffe, A.P. Transcriptional regulation in the context of chromatin structure. **Essays in Biochemistry**, v.37, p.45–57, 2001.

Zhao, M., Shirley, C.R., Yu, Y.E., Mohapatra, B., Zhang, Y., Unni, E., Deng, J.M., Arango, N.A., Terry, N.H.A., Weil, M.M., Russell, L.D., Behringer, R.R., Meistrich, M.L. Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. **Molecular and Cellular Biology**, v.21, p.7243–7255, 2001.

Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., Zenzes, M.T. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. **Fertility and Sterility**, v.75, p.674–677, 2001.

ANEXO

9. ANEXO

Anexo I

AJUSTE DO HTMA-IVOS-10 PARA ANÁLISE SEMINAL EM EQÜINOS

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

TRABALHO CIENTÍFICO

10. TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho a ser enviado a Revista Veterinária e Zootecnia.

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO
DE SÊMEN REFRIGERADO DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA
MARCHADOR E QUARTO DE MILHA.**

**COMPARISON OF DIFFERENCES STORAGE TEMPERATURES IN COOLING
SEMEN OF MANGALARGA MARCHADOR AND QUARTER HORSES
STALLIONS**

**COMPARACIÓN DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE
ALMACENAMIENTO DE SEMEN REFRIGERADO DE CABALLOS
MANGALARGA MARCHADOR Y CUARTO DE MILLA.**

Marcel Cavalcanti Farrás^a
Eduardo Gorzoni Fioratti^b
Carlos Ramires Neto^c
Marcio Teoro do Carmo^d
Rogério Antônio de Oliveira^e
Frederico Ozanan Papa^f
José Nicolau Próspero Puoli Filho^g
Marco Antônio Alvarenga^h

Marcel Cavalcanti Farrás, mcfvet@hotmail.com.

Entidade Financiadora: FAPESP (2009/06835-1; 2010/09387-7)

a- Mestrando do Departamento de Reprodução da FMVZ, Unesp, campus de Botucatu.

b- Doutorando do Departamento de Reprodução da FMVZ, Unesp, campus de Botucatu.

c- Aluno de graduação da FMVZ, Unesp, campus de Botucatu.

d- Pós-doutorando do Departamento de Reprodução da FMVZ, Unesp, campus de Botucatu.

e- Professor do Departamento de Bioestatística do IBB, Unesp, campus de Botucatu

f- Professor do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ, Unesp, campus de Botucatu.

g- Professor do Departamento de Produção Animal da FMVZ, Unesp, campus de Botucatu.

h- Professor do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ, Unesp, campus de Botucatu.

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE ARMAZENAMENTO DE SÊMEN REFRIGERADO DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR E QUARTO DE MILHA.

RESUMO

Há muitos anos várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de prolongar a longevidade espermática através da refrigeração ou criopreservação do sêmen equino e com isso melhorar as taxas de fertilidade. Muitas dessas pesquisas têm como objetivo desenvolver diluidores, aditivos, curvas e protocolos de refrigeração, assim como tempos e temperaturas de estocagem que garantam a motilidade e integridade do sêmen equino submetido à refrigeração e com isso índices de fertilidade melhores e menos variáveis. Nos últimos anos, houve um aumento considerável na utilização de sêmen equino refrigerado, principalmente devido à aceitação de grande parte das associações de criadores de cavalos. A raça Mangalarga Marchador, de origem nacional, tem se mostrado extremamente sensível ao processo de manipulação, refrigeração e transporte de sêmen (2). Como em outras espécies de produção, o sucesso da inseminação artificial nos equinos depende da manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen durante o armazenamento (11). Além disso, quanto maior o tempo ao qual se mantém o potencial fertilizante do sêmen refrigerado, maior flexibilidade terá o médico veterinário para coletar e enviar o sêmen aos haras em que as éguas se encontram (18), resultando num maior êxito da técnica (4). O presente experimento teve por objetivo comparar as raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM) quanto à resistência à refrigeração em duas temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado (5°C e 15°C). Os resultados deste trabalho demonstraram que não houve diferença entre as temperaturas de armazenamento (5°C e 15°C), mostrando que ambas são eficientes na manutenção da viabilidade espermática pelo período de 24 horas para ambas as raças estudadas. Além disso, foi observada uma característica espermática superior dos garanhões da raça Quarto de Milha quando comparada aos da raça Mangalarga Marchador, tanto nos parâmetros de velocidade espermática, avaliado pelo CASA, revelando uma maior sensibilidade dos animais da raça Mangalarga ao processo de refrigeração do sêmen.

Palavras-chave: Garanhão, Sêmen Refrigerado, Mangalarga Marchador e Quarto de Milha.

COMPARISON OF DIFFERENCES STORAGE TEMPERATURES IN COOLING SEMEN OF MANGALARGA MARCHADOR AND QUARTER HORSES STALLIONS

ABSTRACT

Lately, several studies have been conducted in order to prolong sperm longevity using cooling or frozen-thawed equine semen and in that way improve fertility rates. Many of these studies have focused on developing extenders, additives, cooling curves and protocols, as well as storage times and temperatures to ensure the integrity and motility of equine semen exposed to cooling. Recent years have increased the use of cooled equine semen, mainly due to the acceptance of the horse breeders associations. The Brazilian breed called "Mangalarga Marchador" has proven to be extremely sensitive to the cooling semen (2). As in other species, the success of artificial insemination in horses depends on maintaining the viability and fertility of semen during storage (11). Moreover, the longer you keep the cooling semen fertilizing potential, more flexibility will have the veterinarian to collect and send the semen samples (18), resulting in higher technique success (4). The aim of this study was to compare breeds Mangalarga Marchador (MM) and Quarter Horses (QM) for resistance to cooling in two semen storage systems (5°C and 15°C). The results showed no difference between the storage temperatures (5°C and 15°C), showing that both are effective in maintaining sperm viability for a period of 24 hours for both breeds studied. In addition, we observed superior sperm characteristics for Quarter Horse stallions when compared to the Mangalarga Marchador, evaluated by CASA, revealing a higher sensitivity for the cooling process by Mangalarga Marchador stallions.

Keywords: Stallion, Cooled Semen, Mangalarga Marchador e Quarter Horse.

COMPARACIÓN DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO DE SEMEN REFRIGERADO DE CABALLOS MANGALARGA MARCHADOR Y CUARTO DE MILLA.

RESUMEN

Últimamente, varios estudios se han realizado con el fin de prolongar la longevidad de los espermatozoides mediante refrigeración o criopreservación del semen equino y de esa manera mejorar las tasas de fecundidad. Muchos de estos estudios se han centrado en los diluyentes, aditivos, curvas de enfriamiento y protocolos, así como los tiempos y temperaturas de almacenamiento para garantizar la integridad y la motilidad del semen equino expuestos al enfriamiento. En los últimos años han aumentado el uso de semen refrigerado equino, principalmente debido a la aceptación de las asociaciones de criadores de caballos. La raza brasileña "Mangalarga Marchador" ha demostrado ser extremadamente sensible a la refrigeración del semen (2). Como en otras especies, el éxito de la inseminación artificial en los caballos depende del mantenimiento de la viabilidad y fertilidad del semen durante el almacenamiento (11). Por otra parte, cuanto más tiempo se mantenga el potencial fertilizante, más flexibilidad tendrá el veterinario para coleccionar y enviar las muestras de semen (18), lo que resulta en mejores resultados de la técnica (4). El objetivo de este estudio fue comparar las razas Mangalarga Marchador (MM) y Caballos Cuarto de Milla (CM) para la resistencia a la refrigeración en dos temperaturas de almacenamiento de semen (5°C y 15°C). Los resultados no mostraron diferencia entre las temperaturas de almacenamiento (5°C y 15°C), mostrando que ambos son efectivos en el mantenimiento de la viabilidad espermática por un período de 24 horas para ambas las razas estudiadas. Además, se observó características espermáticas superiores de los sementales Cuarto de Milla en comparación con los Mangalargas Marchadores, evaluada por CASA, revelando una mayor sensibilidad para el proceso de refrigeración para la raza Mangalarga Marchador.

Palabras clave: Semental, semen refrigerado, Mangalarga Marchador y Cuarto de Milla.

1-INTRODUÇÃO

Atualmente, a comercialização e o transporte de sêmen, tanto refrigerado como congelado, se tornaram uma das atividades mais frequentes dentre as realizadas pelas centrais de reprodução equina no Brasil. Não só devido à aceitação das associações de criadores de cavalos, como também ao desenvolvimento de novas tecnologias permitindo com que o sêmen seja transportado da propriedade em que o garanhão se encontra até a propriedade em que a égua está alojada (21). O fato de se transportar o sêmen até as éguas, ao invés de transportá-las até o garanhão oferece inúmeras vantagens, como a eliminação de gastos com transporte, a diminuição do estresse animal, a diminuição dos riscos impostos aos potros e as próprias matrizes de possíveis acidentes e de adquirir doenças, como resultado da exposição a patógenos em seu novo ambiente, além, destas propriedades serem, na grande maioria, distantes e dispenderem altos custos com a hospedagem dos animais (5). O armazenamento do semen em baixas temperaturas tem como objetivo prolongar a viabilidade espermática por reduzir o consumo de energia (1). Porém, durante o processo de redução de temperatura, ocorre reorganização nos lipídeos da membrana plasmática, e a formação de alguns subprodutos indesejáveis o que acarreta diretamente na diminuição da longevidade dos espermatozoides (9). A raça Mangalarga Marchador, de origem nacional, tem se mostrado extremamente sensível ao processo de manipulação, refrigeração e transporte de sêmen diferentemente de garanhões das raças Quarto de Milha, Brasileiro de Hipismo e outras de origem internacional (2). O objetivo deste estudo foi comparar a resistência do sêmen refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador (MM) com indivíduos da raça Quarto de Milha (QM), e definir qual a melhor temperatura de armazenamento de sêmen para os cavalos destas raças.

2-MATERIAIS E MÉTODOS

O presente experimento avaliou duas temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado, 5°C e 15°C, de garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM) quanto aos padrões de velocidade computadorizada e integridade de membrana.

2.1-ANIMAIS

Foram utilizados dois ejaculados de 27 garanhões (n=54 ejaculados), com idade entres 4 e 12 anos, sendo 11 da raça Mangalarga Marchador (MM) e outros 16 da raça Quarto de Milha (QM).

2.2-COLHEITA DOS EJACULADOS

A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial. Foi empregada a metodologia da colheita fechada, com a temperatura da vagina artificial em torno de 45°C. Para que o garanhão efetuasse a monta, utilizou-se de uma égua no cio, devidamente contida, ou de manequim próprio para a monta de garanhões.

2.3-PROCESSAMENTO DO SÊMEN

Após a colheita dos ejaculados, estes foram filtrados, para que fosse descartada a fração gel, o volume mensurado em proveta graduada e uma alíquota do sêmen foi separada para avaliação da motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), percentual de espermatozoides rápidos (RAPID) através da análise computadorizada (CASA - Hamilton Thorn – HTMIVOS 10), bem como a integridade de membrana plasmática (Iodeto de Propídeo), integridade acrossomal (FITC-PSA) e potencial mitocondrial (JC-1) segundo a metodologia descrita por (7). A avaliação da concentração espermática foi realizada em microscópio de luz (200x) com auxílio de uma câmara de Neubauer após diluição de 10µL de sêmen em 190 µL de água destilada (1:20).

Após análise, o sêmen foi diluído em meio comercial (Botusemen®), em proporções que variaram de 2:1 a 5:1 a fim de se conseguir uma concentração de 50×10^6 sptz/mL e então se iniciou o processo de refrigeração nas caixas térmicas conhecidas por Botutainer® (5°C) e Botubox® (15°C). As análises foram realizadas nos momentos 0, após 12 e 24 horas de refrigeração.

2.4-ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Para cada variável avaliada, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de um delineamento em blocos, sendo cada animal considerado um bloco e os tratamentos no esquema fatorial com os fatores: raça, caixas térmicas, tempo de armazenamento e ejaculado. A comparação entre as médias dos níveis de cada fator foi realizada pelo teste de Tukey, com nível de 5% de significância.

3-RESULTADOS

As temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado (5°C e 15°C), avaliados independentemente do fator raça, não demonstraram qualquer diferença em todos os parâmetros avaliados, conforme pode ser observado nas tabelas de 1 a 5.

Ao se comparar as raças Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, independente dos sistemas e tempo de armazenamento observou-se diferença estatística ($P < 0,05$) favorável à raça Quarto de Milha, para os parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP) e percentual de espermatozoides rápidos (RAPID), conforme descrito nas tabelas 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Com relação à integridade das membranas não foi encontrada diferença ($P > 0,05$) nos subtipos celulares que apresentavam membrana plasmática e acrossomal íntegra, com alto potencial mitocondrial (PIAIA) (Tabela 5).

Ao se avaliar somente o tempo em que o sêmen foi acondicionado nos dois sistemas de armazenamento, observou-se que a motilidade total (Tabela 1) e o percentual de espermatozoides rápidos (Tabela 4) apresentaram diferença em todos os momentos avaliados, ou seja, conforme esperado o sêmen no momento 0 apresentou melhores resultados que o sêmen armazenado por um período de 12 horas, que por sua vez se apresentou melhor que o acondicionado por um período de 24 horas.

A motilidade progressiva (Tabela 2) e o VAP (Tabela 3) mostraram um mesmo comportamento com relação ao tempo. Em ambos os casos, o sêmen no momento 0 não mostrou diferença ($P > 0,05$) do sêmen refrigerado no momento 12 horas, porém foi diferente do refrigerado no momento 24 horas ($P < 0,05$). Em contra partida, o sêmen refrigerado por 12 horas não mostrou diferença do armazenado por 24 horas ($P > 0,05$).

Quando da avaliação da integridade das membranas espermáticas, os subgrupos celulares PIAIA foram diferentes no momento 0 ($P<0,05$) quando comparado ao sêmen armazenado por 12 e por 24 horas nos sistemas de armazenamento de sêmen refrigerado.

TABELA 1: Média e Desvio Padrão (%) da Motilidade Total (MT) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^b	24 ^c
MT	MM	5 ^A	75,00±12,08	65,17±18,86	55,72±24,18
		15 ^A	75,00±12,08	67,17±14,20	58,61±26,06
	QM	5 ^B	80,44±8,39	76,81±10,81	72,72±13,52
		15 ^B	80,44±8,39	76,97±11,82	73,22±14,54

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Conforme demonstrado na Tabela 1, não foi observada diferença estatística ($P>0,05$) com relação às temperaturas de armazenamento. Porém pode-se verificar diferença estatística ($P<0,05$), com superioridade da raça Quarto de Milha, no parâmetro de motilidade total. Os tempos de armazenamento foram diferentes no momento 0, 12 e 24 horas de refrigeração.

TABELA 2: Média e Desvio Padrão (%) da Motilidade Progressiva (MP) dos garanhões das raças Mangalarga Mangalarga (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^{ab}	24 ^b
MP	MM	5 ^A	32,50±11,21	28,72±14,93	25,00±18,64
		15 ^A	32,50±11,21	26,28±12,03	22,17±16,07
	QM	5 ^B	41,84±11,84	41,81±13,17	39,69±14,49
		15 ^B	41,84±11,84	38,81±13,92	34,47±14,35

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Foi observada diferença estatística ($P<0,05$) na motilidade progressiva (MP) entre as raças estudadas, com superioridade para os animais da raça Quarto de Milha. Entre as temperaturas de armazenamento não houve diferença ($P>0,05$). Em relação aos tempos de armazenamento não houve diferença ($P>0,05$) entre o sêmen no momento 0 e o armazenado

por 12 horas e entre os tempos de 12 e 24 horas, porém houve diferença ($P<0,05$) entre os momentos 0 e 24.

TABELA 3: Média e Desvio Padrão da velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), medida em $\mu\text{m/s}$ pelo HTMA, dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^{ab}	24 ^b
VAP	MM	5 ^A	132,83±19,31	113,89±28,54	108,67±36,63
		15 ^A	132,83±19,31	121,00±22,89	106,78±39,21
	QM	5 ^B	130,06±19,51	127,02±12,27	115,29±19,82
		15 ^B	130,06±19,51	124,81±26,37	122,53±16,32

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Quando avaliada a velocidade espermática ao longo de uma trajetória média (VAP), medida em $\mu\text{m/s}$ pelo CASA, foi observada diferença ($P<0,05$) entre as raças. As temperaturas de armazenamento não apresentaram diferença ($P>0,05$). Em relação aos tempos de armazenamento, não houve diferença ($P>0,05$) entre os momentos 0 e 12 horas e para os momentos 12 e 24 horas, e houve diferença ($P<0,05$) entre os momentos 0 e 24, conforme pode ser observado na Tabela 3.

TABELA 4: Média e Desvio Padrão (%) do percentual de espermatozoides rápidos (RAP) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24, e no TTR (37°C por 4 horas) nos momentos 12 e 24 horas.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^b	24 ^c
RAP	MG	5 ^A	66,94±13,76	55,78±24,22	45,50±23,80
		15 ^A	66,94±13,76	56,44±17,76	49,56±23,79
	QM	5 ^B	74,22±10,61	69,78±12,79	64,34±15,67
		15 ^B	74,22±10,61	69,13±14,93	64,44±17,21

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Observou-se também, conforme demonstrado na Tabela 4, diferença estatística ($P<0,05$) no percentual de espermatozoides rápidos (RAP) entre as raças, com superioridade dos indivíduos da raça Quarto de Milha. Entre as temperaturas de

armazenamento não foi demonstrado diferença ($P>0,05$). Os tempos de armazenamento foram diferentes em todos os momentos avaliados ($p<0,05$).

TABELA 5: Média e Desvio Padrão (%) do percentual de espermatozoides que apresentam Membrana Plasmática Inteira, Acrossomo íntegro e Alto potencial mitocondrial (PIAIA) dos garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Quarto de Milha (QM), nos sistemas térmicos de 5 e 15°C, nos tempos 0, 12 e 24.

VARIÁVEL	RAÇA	CAIXA TÉRMICA	TEMPO		
			0 ^a	12 ^b	24 ^c
PIAIA	MM	5 ^A	64,06±8,54	50,72±9,86	44,50±12,20
		15 ^A	64,06±8,54	51,78±8,91	42,06±12,20
	QM	5 ^A	57,69±13,13	49,56±12,55	43,91±12,40
		15 ^A	57,69±13,13	52,09±11,36	44,91±11,79

Letras maiúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes. Letras minúsculas: comparam as médias das raças nos sistemas térmicos correspondentes, ao longo dos tempos avaliados.

Conforme demonstrado na Tabela 5, não houve diferença estatística ($P>0,05$) na avaliação de integridade de membrana plasmática, potencial mitocondrial e integridade acrossomal para a variável PIAIA (Membrana Plasmática Inteira, Acrossomo íntegro e Alto potencial mitocondrial) entre as raças, assim como nos sistemas térmicos avaliados. Já os tempos de armazenamento foram diferentes ($P<0,05$) em todos os momentos avaliados.

4-DISCUSSÃO

O sucesso da preservação espermática, através da refrigeração está diretamente relacionado a fatores como: diluição, curva de refrigeração lenta e temperatura de armazenamento que reduza o metabolismo espermático minimizando os danos à membrana plasmática (14). (20) recomendam uma diluição do ejaculado a uma concentração de 25 e 50 x 10⁶ spz/ml, principalmente pelo fator deletério do plasma seminal sobre o resfriamento e armazenamento do sêmen equino a 5° C.

A utilização das biotecnologias do sêmen, tanto refrigerado como congelado, viabiliza o uso de um reprodutor em momentos nos quais não seria possível a monta natural, devido, principalmente às grandes distâncias encontradas entre o haras em que este se encontra e as propriedades das éguas (21), além disso, com a grande procura do sêmen de alguns garanhões geneticamente superiores, podemos otimizar seu uso pela possibilidade de um ejaculado ser fracionado em várias doses, que podem ser enviadas a

distintas regiões do país, além disso, preservamos a saúde destes garanhões, eliminamos os gastos inerentes ao transporte tanto do macho como da fêmea, diminuimos o estresse animal, os riscos do transporte de potros e matrizes de possíveis acidentes e adquirir novas doenças (5), e ainda aumentamos o número de animais a serem acasalados com um determinado reprodutor.

Sabe-se que a capacidade fertilizante, usualmente é associada à qualidade da motilidade e a morfologia espermática (17; 10), porém estas não possuem uma correlação absoluta, dessa forma, pode se dizer que o parâmetro da motilidade é menos preciso do que a real fertilidade das amostras de sêmen para se estimar a viabilidade espermática (6). Assim, buscando uma maior correlação entre as características de movimento e a capacidade fertilizante, (12) verificaram que a motilidade total, progressiva e velocidade média (VAP) podem prever melhor sobre a fertilidade, demonstrando a importância do uso da análise computadorizada para se obter uma maior acuidade às avaliações.

O presente experimento teve por objetivo central avaliar e determinar o efeito do processo de refrigeração de sêmen sobre a qualidade espermática. Os indivíduos da raça Mangalarga Marchador mostraram de uma forma geral maior sensibilidade ao processo de refrigeração quando comparado aos da raça Quarto de Milha tanto no armazenamento a 5°C, quanto no de 15°C, nos momentos 12 e 24 horas. Esta maior sensibilidade foi observada nos parâmetros de MT (Tabela 1), MP (Tabela 2), VAP (Tabela 3), RAP (Tabela 4).

No parâmetro motilidade total foram observados valores de aproximadamente 77% para os Quarto de Milha e 67% para os garanhões da raça Mangalarga Marchador no período de 12 horas e de aproximadamente 73% *versus* 57% quando armazenado por 24 horas em ambos os sistemas de armazenamento, ou seja, do momento 0 para o 12 horas e do 12 para o 24 horas, houve uma queda de 10 pontos percentuais para os MM e 4 para os QM em ambos os períodos.

Apesar de a literatura ser omissa na comparação entre raças e sua relação com resistência à refrigeração de sêmen, uma maior sensibilidade dos garanhões da raça Mangalarga foi observada por (2) quando comparou sêmen submetido à congelamento de garanhões das raças MM, QM e HIPISMO. Este mesmo autor verificou que os indivíduos da raça MM foram os menos resistentes, onde somente 11,7% dos garanhões avaliados apresentaram uma MT maior que 40% após o processo de descongelamento, enquanto no grupo das raças QM e HIPISMO, 50 e 53,8% apresentaram uma MT maior que 40%.

Uma queda marcante na motilidade progressiva no sêmen refrigerado de cavalos da raça MM foi observada, conforme observado na Tabela 2. Concordando com o estudo de (2) que verificaram que 5,8% dos garanhões obtiveram $MP > 20\%$, enquanto foi observado 41,6% dos cavalos da raça QM e 30,7% dos garanhões de Hipismo.

Além da MT e MP, nosso estudo demonstrou que a raça MM foi mais sensível ao processo de refrigeração do que a raça Quarto de Milha com relação às velocidades espermáticas e porcentagem de espermatozoides rápidos (Tabela 4).

As temperaturas de armazenamento, 5°C e 15°C, não apresentaram diferenças significativas entre si ($P > 0,05$), em todos os parâmetros avaliados para todos os indivíduos tanto dos garanhões da raça MM quanto para os QM. Demonstrando que ambos os sistemas de armazenamento de sêmen são adequados para a manutenção das características da qualidade do sêmen, corroborando com os achados de (3, 8, 15).

Alguns estudos demonstram que a manutenção da temperatura em torno de 5°C é preferencial a de 20°C (13, 22), ressaltando que o intervalo entre 4-6°C é o mais adequado para a manutenção da motilidade e da fertilidade (16,19). (3) não encontraram diferença entre os sistema de armazenamento. Neste trabalho, foram comparados duas temperaturas de refrigeração a 5°C e 15°C, à temperatura ambiente de 25°C. As características de motilidades total e progressiva, bem como a integridade de membrana não foram afetadas pela temperatura de armazenamento, assim como nos estudos de (15) e (8) que não encontraram diferença quando compararam os sistemas de armazenamento de sêmen a 5°C e 15°C.

5-CONCLUSÕES

A partir dos resultados e nas condições em que o experimento foi realizado, podemos concluir que as temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado equino a 5°C e 15°C são eficientes tanto na manutenção das características de motilidade e integridade de membrana e se comportam de maneira similar por um período de até 24 horas. Além disso, a raça Mangalarga Marchador apresentou uma maior sensibilidade quanto à manutenção da qualidade seminal após refrigeração do sêmen quando comparada à raça Quarto de Milha.

6-REFERENCIAS

1. Althouse, G. C., Wilson, M.E., Kuster, C., Parsley, M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. **Theriogenology**, v.50, p.535-546, 1998.
2. Alvarenga, M.A. Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para sêmen de garanhões. Botucatu, 2003. **Tese (Livredocência)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
3. Avanzi, B. R.; Farrás, M. C.; Melo, C. M.; Alvarenga, M. A.; Dell’aqua Jr, J. A.; Medeiros, A. S. L.; Araújo, G. H. M.; Papa, F. O. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 152-154, 2006.
4. Batellier, F.; Vidament, M.; Fauquant, J.; Duchamp, G.; Arnaud, G.; Yvon, J.M.; Magistrini, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.
5. Brinsko, S. P. & Varner, D. D. Artificial insemination and preservation of semen. In Blanchar, T.L.; Varner, D.D. Stallion management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.8, n.1, p.205-218, 1992.
6. Carvalho, G. A.; Papa, F. O. Estudo de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermática utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 332-334, 2003.
7. Celeghini, C.C.C.; Arruda, R.P.; Silva, F.H.A.; Faria, D.E.; Andrade, A.F.C.; J. Raphael, C.F. Utilization of fluorescent probe association for membrane simultaneous assessment of plasmatic, acrossomal and mitochondrial membrane of rooster spermatozoa. **Revista Brasileira Cienc. Avic.**, v.9(3), 2007.
8. Farrás, M. C.; Avanzi, B. R.; Melo, C. M.; Dell’Aqua, J. A.; Papa, F. O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, pg693-699, 2008.
9. Holt, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000.
10. Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p.3-22, 2000b.
11. Ijaz, A.; Ducharme, R. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C. **Theriogenology**, v.44, p.1039-1050, 1995.
12. Jasko, J.; Little, T. V.; Lein, D. H.; Foote, R. H. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987–1988). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, p. 979-985, 1992.
13. Kayser, J. P.; Amann, R. P.; Shideler, E. L.; Jasko, D. J.; Pickett, B. W. Effect of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601-614, 1992.

14. Loomis, P. R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: Annual Convention Of American Association Of Equine Practitioners, 38., 1992. **Proceedings...**, 1992. p.629-647.
15. Machado, M. S.; Leão, K. M.; Gomes, G. M.; Macedo, L. P.; Alvarenga, M. A. Efeitos de diferentes sistemas de transporte sobre a qualidade do sêmen refrigerado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.194-196, 2002.
16. Palmer, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. **Proceeding of the 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination 3**, 1984, p.377-379.
17. Parks, J., Graham, J. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.
18. Pickett, B. W. The stallion: Retrospective analysis and opinions. **Biology Reproduction (Mono 1)**, p.547-564, 1995.
19. Squires, E.L.; Amann, R.P.; Mckinnon, A.O.; Pickett, B.W. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5oC or 20oC. In: International Congress In Animal Reproduction And Artificial Insemination, 11., 1988, Dublin. **Proceedings...** Dublin, 1988. p.297-299.
20. Squires, E. L. & Brinsko, S. P. Factors affecting fertility of cooled semen. In: Annual Meeting Of Equine Nutrition And Physiology Society, 1997, Fort Worth. **Proceedings...**Colorado State University, 1997. p.4-9.
21. Squires, E. L., Brubaker, J. K., Mccue, P. M., Pickett, B. W. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. **Theriogenology**, v.28, p.709-718, 1998.
22. Varner, D. D.; Blanchard, T. L.; Love, C. L.; Garcia, M. C.; Kenney, R. M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoa motility parameters. **Theriogenology**, v.29, p.1043-1054, 1988.

Normas Revista Veterinária e Zootecnia:

• Artigos Científicos

Devem ser estruturados de acordo com os seguintes itens:

1. Página de rosto, com:

- Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em letra maiúscula. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira chamada de rodapé;
- Nomes completos dos autores, em que somente a primeira letra de cada nome deve ser maiúscula, do lado direito da página. Digitá-los, separados um por linha, com **chamadas** de rodapé numeradas e em sobrescrito, **que indicarão** o cargo e o endereço profissional dos autores, seguidos da instituição onde o trabalho foi desenvolvido ou às quais estão vinculados;
- Nome, endereço, telefone, fax e correio eletrônico, para correspondência;
- Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação, encaminhar o parecer da Comissão de Ética ou equivalente, assinalando, no trabalho, antes das referências, a data de aprovação.

2. Página com resumo, abstract e resumen

- Tanto o resumo, como o abstract e o resumen devem ser seguidos do título do trabalho, no respectivo idioma, e conter no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à introdução, metodologia, resultados e conclusões. O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO. O abstract, e o resumen devem ser tradução fiel do resumo. Independente da língua em que o artigo for apresentado, deverá conter o resumo em português, inglês e espanhol.
- Devem conter, no máximo, cinco palavras-chave, key words, e palabras-clave que identifiquem o conteúdo do texto.

3. A estrutura do artigo deverá conter:

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

Material e Métodos: Deve oferecer informações de reprodutibilidade da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra, equipamentos e métodos

utilizados, inclusive os estatísticos.

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

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

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

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

Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos, Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para fotografias, desenhos e mapas, **em três vias (uma original e duas cópias)** impressas, formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço duplo, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada página, fonte Times New Roman, tamanho 12 e numeração consecutiva das páginas em algarismos arábicos, a partir da folha de identificação. Deverão também apresentar numeração nas linhas, reiniciando a contagem a cada nova página. Ilustrações e legendas devem ser apresentadas em folhas separadas. Encaminhar cópia em disquete 3 ½" de alta densidade ou CD, identificado com título do artigo e nome dos autores. Nas duas cópias **deve(m) ser omitido(s) o(s) nome(s) do(s) autor(es), o local onde se realizou o trabalho, bem como o rodapé.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos estarão disponíveis no formato PDF no endereço eletrônico da revista. Para as demais seções da revista são válidas as normas anteriores. Não devem exceder a 15 páginas. Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na primeira utilização.