

Cely Marini Melo

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

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

Orientador: **Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa**

Botucatu -SP

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Melo, Cely Marini.

Efeito do armazenamento por 24 horas em diferentes sistemas de refrigeração sobre a viabilidade e fertilidade de sêmen congelado eqüino / Cely Marini Melo. – 2005.

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

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Assunto CAPES: 50504002

1. Eqüino - Reprodução

CDD 636.10824

Palavras-chave: Eqüino; Congelação de sêmen; Fertilidade; Transporte refrigerado

À Deus, *Grande Arquiteto do Universo*,
pela vida.

Aos meus pais, *Jorge* e *Rosane*, pelo
constante incentivo, pelo exemplo de
moral e conduta, pelo amor
incondicional.

Aos meus avós, *Cely* e *Aloysio*, por
serem meus segundos pais, por
estarem ao meu lado em todos os
momentos da minha vida.

Ao meu irmão, *Marcos*, pela
admiração , pelo apoio, carinho e amor
sempre.

Aos meus familiares, em especial à
querida Tia Lili, Tio Carlos e Cris, pelo
apoio e incentivo constantes.

Aos animais....

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Frederico O. Papa, exemplo de competência, respeito e ética profissional. Meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, por ter confiado em mim e pela amizade durante toda a nossa convivência. Seus ensinamentos serão levados por toda a minha vida.

Ao Prof. Marco Alvarenga, por me incentivar a fazer a Residência, pela amizade, ensinamentos e confiança ao longo destes anos de convivência.

À Professora Denise, pela oportunidade de estagiar em Botucatu, por ser sempre solícita, pelas palavras amigas e os conselhos.

À Profa. Fernanda, pelo convívio, ensinamentos e estar sempre disposta a ajudar a solucionar os problemas.

Aos Professores Nereu e João, minha admiração pelo respeito às pessoas e aos animais. Obrigada pela amizade e carinho dispensados.

Aos docentes do Departamento de Reprodução Animal: Sony, Eunice e Meira pelos ensinamentos e exemplo profissional.

Aos funcionários Cristina, Márcio, Miguel, Tico, Walter, Edílson e Marquinho, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Às amigas Andréa, Bina e Clarissa, por entenderem que apesar da distância nossos laços de amizade serão eternos.

Ao amigo Ian Martin, pela amizade sincera, companheirismo, por estar ao meu lado sempre e principalmente na realização deste experimento. Muito obrigada por alegrar minha vida!

À amiga Ana Izabel, por me ensinar a entender os felinos, pelas longas conversas, autenticidade, pelos momentos sérios e divertidos, que passamos juntas.

À amiga Cassinha, pela grande ajuda durante o desenvolvimento do trabalho, pelos conselhos científicos, pela amizade.

À amiga Bió, pelo exemplo de competência profissional, por auxiliar na fase inicial da Dissertação e pela amizade.

Às queridas amigas Lucianas (Leal e Batalha) pela excelente convivência, incentivo e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Andrologia: Letícia, Zé, Karina, André, Edinho por me auxiliarem, pela troca de conhecimentos e por me ajudarem a crescer profissionalmente.

Aos colegas do REPAS: Vivi, Fá, Cris, Jorge pela troca de conhecimentos e alto astral de sempre.

Aos colegas de Pós-Graduação: Neto, Felipe, Claudinha, Karen Leão, Milena, João, Carla Ponchirolli, Camila, Carla Moya, Gustavo, Adriano, Edmilson, Hymerson, Marciane, Leandro, pelo convívio.

Aos amigos Douglas, Bruna Gruppi, Cláudio, Tomé, Rogério, Tiago e André.

Às funcionárias da Pós-Graduação: Denise, Maria e Regina, pela atenção, paciência e boa vontade dispensadas.

Ao Prof. Adalberto, por me auxiliar na confecção da estatística do presente trabalho, sempre com boa vontade e bom humor.

À CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

Ao Haras Agromen pelo apoio durante a realização deste trabalho.

À Purina pela doação de ração aos animais.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Biotecnologia de sêmen eqüino.....	20
2.1.1. Sêmen Refrigerado.....	20
2.1.1.1. Sistemas de transporte e taxas de refrigeração.....	20
2.1.2 Diluentes e Manutenção da Viabilidade Espermática.....	22
2.1.1.3. Plasma Seminal e Refrigeração.....	24
2.1.2. Sêmen congelado	25
2.1.2.1. Princípios da criopreservação.....	26
2.1.2.2. Processo de Criopreservação.....	27
2.1.3. Crioprotetores.....	29
2.1.3.1. Mecanismo de ação.....	30
2.1.3.2. Crioprotetores não penetrantes.....	31
2.1.3.3. Crioprotetores penetrantes.....	34
2.2. Métodos de avaliação dos parâmetros espermáticos.....	38
2.2.1. Motilidade espermática.....	38
2.2.2. Integridade da membrana plasmática.....	39
3. Fertilidade com sêmen congelado.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. Experimento I: Comparação entre as metodologias de congelação de sêmen.....	44

4.1.1. Animais.....	45
4.1.2. Colheita de sêmen.....	45
4.1.3. Análises laboratoriais.....	45
4.1.4. Processamento das amostras.....	46
4.1.4.1. Metodologia convencional.....	46
4.1.4.2. Metodologia equitainer.....	47
4.1.5. Descongelamento do Sêmen.....	47
4.2. EXPERIMENTO II: Estudo da congelação de sêmen utilizando-se diferentes crioprotetores após refrigeração em dois sistemas.....	48
4.2.1. Animais.....	49
4.2.2. Colheita de sêmen.....	49
4.2.3. Análises laboratoriais.....	49
4.2.4. Processamento das amostras.....	49
4.3. Teste de fertilidade.....	50
4.3.1. Congelamento da amostras de sêmen.....	50
4.3.2. Análise das amostras descongeladas.....	51
4.3.3. Éguas.....	51
4.3.3.1. Controle do desenvolvimento folicular e indução da ovulação.....	51
4.3.3.2. Inseminação artificial.....	52
4.3.6. Diagnóstico de gestação.....	52
4.4. Análise estatística.....	52
5. RESULTADOS.....	54
5.1. Experimento I.....	55
5.2. Experimento II.....	56

6. DISCUSSÃO.....	72
7.CONCLUSÕES.....	82
8. COMENTÁRIOS FINAIS.....	84
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
10. ANEXO.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela A: Resultados de fertilidade com sêmen congelado (<i>Dados nacionais</i>).....	41
Tabela B: Resultados de fertilidade com sêmen congelado (<i>Dados internacionais</i>).....	42
Tabela 1: Médias e desvios padrão (%) das características espermáticas avaliadas: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (MP) segundo metodologia de congelação.....	55
Tabela 2: Médias e desvios padrão da Motilidade Total em % segundo sistema de refrigeração, independente do crioprotetor.....	56
Tabela 3: Médias e desvios padrão da Motilidade Total em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente da metodologia de congelação.....	57
Tabela 4: Médias e desvios padrão da Motilidade Total em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração.....	57
Tabela 5: Médias e desvios padrão da Motilidade Progressiva em % segundo sistema de refrigeração , independente do crioprotetor.....	58
Tabela 6: Médias e desvios padrão da Motilidade Progressiva em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente do momento da metodologia de congelação.....	59
Tabela 7: Médias e desvios padrão da Motilidade Progressiva em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração.....	59

Tabela 8: Médias e desvios padrão do VCL (velocidade real) em $\mu\text{m/s}$ segundo sistema de refrigeração e momento da metodologia de congelação, independente do crioprotetor.....	60
Tabela 9: Médias e desvios padrão do VCL (velocidade real) em $\mu\text{m/s}$, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente da metodologia de congelação.....	61
Tabela 10: Médias e desvios padrão do VCL (velocidade real) em $\mu\text{m/s}$, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração.....	61
Tabela 11: Médias e desvios padrão da STR (índice progressivo) em % segundo sistema de refrigeração, independente de crioprotetor.....	62
Tabela 12: Médias e desvios padrão da STR (índice progressivo) em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente do momento da metodologia de congelação.....	63
Tabela 13: Médias e desvios padrão da STR (índice progressivo) em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração.....	63
Tabela 14: Médias e desvios padrão da LIN em %, segundo sistema de refrigeração, independente do crioprotetor.....	64
Tabela 15: Médias e desvios padrão da LIN em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente do momento da metodologia de congelação.....	64
Tabela 16: Médias e desvios padrão da LIN em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de	

refrigeração.....	65
Tabela 17: Médias e desvios padrão de RAP em %, segundo sistema de refrigeração, independente do crioprotetor.....	65
Tabela 18: Médias e desvios padrão de RAP em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente do momento da metodologia de congelação.....	67
Tabela 19: Médias e desvios padrão de RAP em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração.....	67
Tabela 20: Médias e desvios padrão da integridade de membrana plasmática (FL) em %, segundo sistema de refrigeração independente do crioprotetor.....	68
Tabela 21: Médias e desvios padrão da integridade de membrana plasmática (FL) em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente da metodologia de congelação.....	68
Tabela 22: Médias e desvios padrão da integridade de membrana plasmática (FL) em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração.....	69
Tabela 23: Médias de Motilidade Total, em %, comparando-se o equino doador e o método de congelação.....	70
Tabela 24: Médias de Motilidade Progressiva, em %, comparando-se o equino doador e o método de congelação.....	70
Tabela 25: Médias de Fluorescência, em %, comparando-se o equino doador e o método de congelação.....	70
Tabela 26: Número de éguas prenhes e vazias de acordo com o garanhão....	71

RESUMO

O presente estudo objetivou a colheita do sêmen de garanhões nos haras, diluição e transporte destas amostras em dois sistemas de refrigeração (Equitainer[®] e Max-Semen Express[®]) para os centros especializados onde foram submetidos ao processo de congelação. No *Experimento I* foi utilizado 01 ejaculado de 12 garanhões de diferentes raças. Após a colheita os ejaculados foram divididos em duas alíquotas: uma submetida ao processo de congelação convencional, utilizando o meio diluidor Botu-Crio[®] e outra diluída com Botu-Semen[®] e armazenada em Equitainer[®] durante 24h. Após a refrigeração o sêmen foi centrifugado e ressuspensionado com Botu-Crio[®] e submetidas ao processo de congelação. As amostras descongeladas foram analisadas pelo CASA e a integridade de membrana plasmática pelo uso de sondas fluorescentes. Os resultados do *Experimento I* mostraram que não houve diferença nos parâmetros avaliados (motilidade total, progressiva e integridade da membrana plasmática) entre a metodologia convencional e a congelação de sêmen após 24h de refrigeração ($p>0,05$). No *Experimento II*, foi utilizado 01 ejaculado de 11 garanhões, os quais foram diluídos e armazenados em dois sistemas de transporte (Equitainer[®] e Max-Semen Express[®]) durante 24h. As amostras foram congeladas, conforme descrito no *Experimento I* utilizando-se a associação do glicerol com dimetilacetamida, dimetilformamida e metilformamida. Após a descongelação a análise dos parâmetros espermáticos demonstrou a superioridade do Equitainer[®] em relação ao Max-Semen Express[®].

($p < 0,05$). A metilformamida associada ao glicerol apresentou resultados superiores aos demais crioprotetores utilizados. O teste de fertilidade comparou amostras congeladas de dois garanhões (A e B) pelos métodos: convencional e pós-refrigeração em Equitainer por 24h. Foram realizadas 40 inseminações em 10 éguas, monitoradas diariamente para controle folicular por meio da ultra-sonografia. Após constatar a presença de um folículo de aproximadamente 35mm foi administrado 10mg EPE (extrato de pituitária eqüina) intravenoso para indução de ovulação. As éguas foram inseminadas com 350×10^6 sptz viáveis no ápice do corno uterino, nos momentos pré e pós-ovulação. O diagnóstico de gestação foi avaliado pela ultra-sonografia com 15 dias pós-ovulação. Foram observadas diferenças nas taxas fertilidade entre os diferentes garanhões, ou seja, o garanhão A 40% e 50% e garanhão B 80% e 80% para os grupos: convencional & congelação pós 24h de refrigeração, respectivamente. Com base nos resultados, conclui-se que técnica de refrigeração durante 24h previamente a criopreservação, manteve as características espermáticas, bem como os índices de fertilidade, viabilizando-se uma nova metodologia de congelação de sêmen eqüino a qual possibilitará uma maior difusão da técnica.

Palavras-chave: Eqüino; Congelação de sêmen; Fertilidade; Transporte refrigerado

ABSTRACT

The aim of the present study was to develop a new method to freeze equine semen. Semen was collected at the stallion farm, diluted, divided into two samples and cooled at Equitainer[®] or Max-Semen Express[®], then transported to an equipped laboratory for freezing. On *Experiment I* used one ejaculate from each of 11 stallions from different breeds. The ejaculates were divided into two parts: one was frozen following a regular protocol and the other was diluted with Botu-Semen[®] and stored at Equitainer[®] for 24 hours. Afterwards, cooled semen was centrifuged and resuspended with Botu-Crio[®] and then frozen. After thawing motility was evaluated by CASA and by fluorescent probes for plasma membrane integrity evaluation. Based on these results of Experiment I concluded that there was no difference between total motility, progressive motility and plasma membrane integrity when comparing the two methods for freezing semen ($p>0,05$). At *Experiment II* one ejaculate from each of 11 stallions was collected, diluted and stored either in an Equitainer[®] or in a Max-Semen Express[®] for 24 hours. The samples were frozen as described on *Experiment I* using the association of glycerol with dimethylformamide, dimethylacetamide and methylformamide. After thawing the results suggested that the Equitainer[®] was better than Max-Semen Express[®] in maintaining sperm viability ($p>0,05$). The association of methylformamide and glycerol was superior to the others. Fertility trials compared the two methods: conventional and cooled/frozen semen. Ten mares were inseminated in a total of 40 cycles; the mares were monitored every day by ovarian ultrasonography. Ovulation was induced using 10mg EPE (equine pituitary extract) intravenously when a follicle of 35mm of diameter was

detected. Inseminations were performed twice, before and after ovulation with 350×10^6 spermatozoa/mL toward the tip of the horn. Pregnancy rates did not differ between stallions: being 40% and 50% for stallion A and 80% and 80% for stallion B when using respectively conventional and cooled/frozen semen methods. Based on these results we can conclude that a new approach for freezing equine semen has been established by this study where cooling stallion semen for 24 hours before freezing maintains sperm viability and fertility.

Keywords: Equine; Frozen semen; Fertility; Cooled semen

Introdução

1) INTRODUÇÃO

A utilização de biotecnologias cada vez mais modernas tem contribuído para o avanço da reprodução de diversas espécies animais, em especial animais de produção. O desenvolvimento de técnicas adequadas para a preservação e armazenamento de sêmen é um dos passos de maior importância neste avanço,, uma vez que possibilita o maior aproveitamento de animais de grande potencial genético, o armazenamento de material genético de animais que não possam – temporária ou permanentemente – serem utilizados na reprodução, ou até de animais ameaçados de extinção, além de permitir o transporte de sêmen a longas distâncias, sendo considerado como o melhor seguro biológico de reprodutores geneticamente superiores.

A evolução das técnicas de congelação de sêmen foi intensa para a espécie bovina; no entanto, apesar dos diversos estudos realizados, os resultados das técnicas de criopreservação de sêmen de garanhões ainda estão bem distantes daqueles obtidos com touros. Talvez, por este motivo, o uso desta biotécnica seja inferior ao do sêmen refrigerado, uma vez que o mesmo no período de refrigeração de até 24h apresente índices de fertilidade bastante semelhantes ao do sêmen fresco.

Em função da dificuldade de se obter uma metodologia que padronize a Biotécnica de congelação de sêmen eqüino, a técnica mais utilizada atualmente no Brasil tem sido a refrigeração e transporte de amostras refrigeradas. Além da dificuldade de se obter resultados satisfatórios, vários problemas ligados à técnica de congelação de sêmen na espécie eqüina podem ser relacionados: custo dos equipamentos, preparação de diluentes para congelação que requerem perfeição na confecção, bem como deslocamentos de todo esse material até as propriedades

rurais (fazendas, haras etc...), que nem sempre preenchem os requisitos básicos necessários para se obter bons índices de congelabilidade, que resultem taxas adequadas de fertilidade. Com base nestas dificuldades para a congelação de sêmen eqüino vislumbra uma nova técnica que pode resolver ou amenizar todos esses problemas, ou seja, colheita do sêmen nos estabelecimentos rurais, diluição, centrifugação ou não, pré-resfriamento em *containers* adequados e o seu envio para centrais ou laboratórios especializados, os quais, detendo uma infra-estrutura adequada, poderão processar e criopreservar amostras de sêmen. Na maioria das vezes o deslocamento de um garanhão do seu *habitat* pode levar a estresses e conseqüentemente a queda da qualidade espermática, a qual terá como tempo de recuperação um período que varia de 90 a 120 dias para o restabelecimento da espermatogênese normal.

As tentativas mais recentes de desenvolver proposta semelhante no Brasil e no exterior não resultaram sucesso na congelação de sêmen eqüino, provavelmente devido à falta de uma metodologia e diluentes adequados para a criopreservação.

O presente estudo teve como objetivo desenvolver uma metodologia inovadora de congelação de sêmen garanhões. Após a colheita dos ejaculados os mesmos foram analisados quando a motilidade e concentração, diluídos com extensores adequados à refrigeração e mantidos em sistemas passivos e submetidos ao processo de congelação.

Revisão de Literatura

2) REVISÃO DE LITERATURA

2.1) Biotecnologia de sêmen eqüino

2.1.1) Sêmen Refrigerado

O uso de sêmen eqüino refrigerado tem aumentado muito nos últimos anos, resultado da sua aceitação entre as associações de criadores de cavalos. Esta técnica facilita em muito o manejo, já que não há necessidade da presença da égua e do garanhão no mesmo local (Squires et al., 1998). O armazenamento do sêmen diluído em baixas temperaturas prolonga a viabilidade espermática pela redução do consumo de energia e da formação de subprodutos (Althouse et al., 1998).

A tecnologia de sêmen refrigerado é estudada com o intuito de manter o potencial fertilizante do sêmen eqüino por vários dias. Na verdade, quanto mais tempo o potencial fertilizante do sêmen refrigerado possa ser estendido, mais fácil será uso do sêmen transportado (Batellier et al., 2001).

Entretanto, apesar da difusão do seu uso, há uma variação considerável nas taxas de fertilidade do sêmen eqüino refrigerado transportado. Os fatores que podem afetar essas taxas incluem: a fertilidade intrínseca do garanhão e da égua, a composição do diluente, a curva de refrigeração e temperatura de armazenamento do sêmen diluído, a dose inseminante (número de espermatozóides móveis), a proximidade da ovulação e o tempo de armazenamento *in vitro*. À medida que o tempo de armazenamento aumenta, a fertilidade do sêmen diminui (Pickett, 1995).

2.1.1.1) Sistemas de transporte e taxas de refrigeração

O sêmen eqüino geralmente é transportado em dispositivos de refrigeração passiva como o Equitainer[®] que resfria a amostra de sêmen a uma taxa inicial de $-0,03^{\circ}\text{C}/\text{min}$. (Squires et al., 1998). De acordo com Kayser et al. (1992) o sêmen eqüino pode ser refrigerado rapidamente de 37 a 20°C , respeitando o

intervalo entre 20 a 5°C com queda da temperatura menor que -0,1°C/min. De acordo com Katila (1997) o sêmen eqüino pode ser refrigerado rapidamente de 35 a 19°C, mas a medida que atinge temperaturas entre 9 e 8°C o espermatozóide eqüino é muito sensível ao "cold shock", ou seja, ao choque frio, e a taxa de refrigeração deve ser diminuída para -0,05°C por minuto.

Com relação ao período de armazenamento, se a inseminação ocorrer até 12 horas após a colheita, o sêmen pode ser armazenado tanto a 20°C ou a 5°C. Entretanto, para estocagem por tempo superior a 12 horas, o sêmen deve ser refrigerado lentamente até 5°C. O armazenamento entre 4 e 5°C é melhor para manutenção das células espermáticas que 0 ou 2°C (Squires et al., 1999).

Machado et al., (2002) realizaram estudo cujo objetivo era testar dois sistemas de refrigeração passiva compostos de dois isopores, um pequeno (15X11 cm) dentro de um maior (25X16cm) com duas fontes de gelo diferentes (gelo reciclável gelatinoso *versus* gelo derivado de polímero Ice Foam®) comparando-os com o dispositivo Equine Express®. Esse estudo comprovou que o dispositivo composto de dois isopores com gelo Ice Foam® realizou uma curva de refrigeração adequada 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 por fluorescência quando comparado a outro sistema. Com isso, demonstrou-se que esse sistema foi eficiente, além de ser uma alternativa economicamente mais viável para o transporte de sêmen eqüino refrigerado que os sistemas importados.

A temperatura em torno de 5°C é tida como preferencial a de 20°C (Varner et al., 1988; Kayser et al., 1992), sendo o intervalo entre 4-6°C mais

adequado para a manutenção da motilidade e da fertilidade (Palmer et al., 1984; Squires et al., 1988). A utilização de diluentes contendo leite é mais adequada ao sêmen refrigerado a temperatura de 4°C (Batellier et al., 1997; Magistrini et al., 1992; Batellier et al., 2001), no entanto amostras refrigeradas à 15°C são favorecidas quando o diluente não contém leite (Magistrini et al., 1992; Batellier et al., 2001). Batellier et al. (2001) concluíram que a utilização do diluente INRA 96, o qual apresenta frações purificadas do leite, pode ser uma alternativa para garanhões que refrigeram mal, sendo eficiente na manutenção da motilidade e da fertilidade, tanto a 15°C, quanto a 4°C.

2.1.2) Diluentes e Manutenção da Viabilidade Espermática

Como em outras espécies de produção, o sucesso da inseminação artificial nos eqüinos depende da manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen durante o armazenamento (Ijaz & Ducharme, 1995). Os esforços para melhorar a conservação do sêmen refrigerado eqüino se concentram na alteração de diluentes bem como na adição de componentes específicos com intuito de manter a integridade de membrana, prevenir o estresse oxidativo e preservar a motilidade do espermatozóide.

Dentro desse objetivo, ao longo dos anos uma variedade de diluentes com a combinação de diversos componentes (açúcares, eletrólitos, tampões, gema de ovo, leite, etc.) têm sido desenvolvidos para a refrigeração de sêmen. Os diluentes a base de leite são considerados práticos e eficientes na proteção do sêmen eqüino durante o armazenamento antes da inseminação artificial (I.A.) e são rotineiramente usados para diluição e armazenamento do sêmen refrigerado entre 4 e 8°C (Batellier et al., 2001).

Os diluentes devem ter o pH e a osmolaridade ajustados para promover um ambiente adequado à sobrevivência espermática. A pressão osmótica deve estar entre 300 e 400mOsm/L, sendo 350mOsm/L geralmente a ideal (Varner, 1991). O pH dos diluentes pode variar de aproximadamente 6,7 a 7,2 sem afetar a qualidade do sêmen (Brinsko & Varner, 1992).

Os açúcares têm sido incluídos nos diluentes de sêmen como substrato exógeno de energia, componentes osmóticos e agentes crioprotetores. Os espermatozóides são capazes de metabolizar a glicose, frutose e a manose, entretanto, os açúcares de maiores pesos moleculares como a lactose, sacarose e rafinose têm baixa permeabilidade e são geralmente considerados crioprotetores extracelulares (Iguer-ouada & Verstegen, 2001).

Carvalho (2003) conduziu um estudo que avaliou a eficácia de diversos diluentes e formas de refrigeração sobre a viabilidade espermática do sêmen eqüino a cada 24 horas durante 96 horas. Baseado nos resultados obtidos, este autor concluiu que os diluentes a base de glicina e leite desnatado acrescido do aminoácido taurina apresentaram resultados superiores dos parâmetros espermáticos sob refrigeração quando comparados aos diluidores contendo gema de ovo e ao diluente a base de leite desnatado e glicose (Kenney et al., 1975). Quanto ao sistema de refrigeração, o que manteve por mais tempo a viabilidade espermática foi a combinação Equitainer[®]/ geladeira (5°C) quando comparada ao método geladeira simples (5°C). Neste mesmo estudo foi realizado teste de fertilidade com amostras refrigeradas por 48, 72 e 96 horas que resultou em índices de prenhez em torno de 70%.

Macedo (2005) avaliou dois antibióticos na composição de dois diluidores (K75 e Kenney) na manutenção da viabilidade e fertilidade do sêmen eqüino

refrigerado a 5°C por 72 horas. Após esse período de refrigeração, o antibiótico amicacina na concentração de 0,2 mg/ml apresentou resultados superiores ($p < 0,05$) à gentamicina quanto aos parâmetros espermáticos motilidade total e progressiva. Apesar de não apresentar diferenças estatísticas de fertilidade, o diluente Kenney acrescido do antibiótico amicacina apresentou resultados numéricos superiores aos encontrados com o uso da gentamicina (66.7 vs. 33.3%).

2.1.1.3) Plasma Seminal e Refrigeração

Altas concentrações de plasma seminal são deletérias aos espermatozóides submetidos à refrigeração e armazenamento. Esses efeitos deletérios podem ser reduzidos coletando e diluindo somente a fração rica em espermatozóides do ejaculado ou pelo uso de altas diluições de diluente para o sêmen. O primeiro método é um tanto trabalhoso além de reduzir o número total de espermatozóides colhidos no ejaculado. O segundo método é freqüentemente utilizado para refrigeração e transporte de sêmen, entretanto alguns garanhões não se beneficiam com esse procedimento, principalmente os oligozoospermicos (Brinsko et al., 2000).

Uma 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 para remoção do plasma seminal. Entretanto, de acordo com Jasko et al. (1992) aproximadamente 5% de plasma seminal são necessários para manter a motilidade do sêmen refrigerado equino.

A centrifugação e remoção parcial do plasma seminal (aproximadamente 88%) antes do armazenamento a 5°C por 24 e 48 horas resultou no aumento dos parâmetros de motilidade do sêmen de garanhões cujos ejaculados tinham baixa

motilidade quando submetidos a refrigeração. Deste modo, o plasma seminal de alguns garanhões parece ter efeito deletério sobre a motilidade espermática, que se torna mais evidente sob condições de refrigeração (Brinsko et al., 2000).

Macedo (2005) comparou amostras centrifugadas e não centrifugadas e refrigeradas utilizando-se os diluentes Kenney, K75 (Botu-semen®) acrescido ou não de álcoolpolivinil (PVA) e meio a base de leite com o aminoácido taurina (Carvalho, 2003). Após 72 horas a 5°C, foi constatado que os parâmetros espermáticos (motilidade total e progressiva e integridade de membrana plasmática) do sêmen centrifugado foram superiores ($p < 0,05$) as amostras não centrifugadas.

2.1.2) Sêmen congelado

O emprego da biotecnologia de sêmen congelado equino tem apresentado inúmeras vantagens, como redução dos gastos e estresse relacionados ao transporte da égua. A utilização do sêmen criopreservado viabiliza o uso do reprodutor em momentos nos quais não seria possível a monta natural ou ainda do sêmen fresco ou resfriado, como é o caso da participação do animal em atividades esportivas e também nos casos onde o animal está inapto a reprodução ou mesmo veio a óbito. Esta biotécnica viabiliza a utilização de garanhões geneticamente superiores de diversos locais do mundo sem os gastos proibitivos inerentes ao transporte tanto do macho como da fêmea, além de aumentar o número de animais a serem acasalados com um determinado reprodutor (Graham, 1996).

No entanto, esta técnica não se apresenta amplamente difundida, devido às taxas razoáveis de fertilidade por parte de alguns garanhões, como também na utilização adequada do mesmo nos programas de inseminação artificial, sendo muitas vezes necessário o deslocamento do garanhão a locais habilitados

onde o sêmen possa ser colhido e processado adequadamente, o que implica em gastos adicionais (Graham, 1996).

O campo da pesquisa em criopreservação de sêmen tem sido amplamente explorado nas últimas décadas. Alguns tipos de pesquisa direcionam seus trabalhos na caracterização dos fluxos hidráulicos a que os espermatozóides são submetidos durante o processo de congelação e descongelação (Holt, 2000).

Para isso foram feitos estudos detalhados de permeabilidade da membrana dos espermatozóides e utilizados parâmetros bioquímicos para sugerir protocolos de resfriamento que fossem minimamente nocivos. Em alguns destes trabalhos, especialmente naqueles relacionados à adição e remoção de crioprotetores, foi obtida ótima recuperação de espermatozóides (Holt, 2000).

2.1.2.1) Princípios da criopreservação

Durante o processo de criopreservação, o sêmen deve ser resfriado desde a temperatura corpórea até a temperatura ambiente ($37^{\circ} \rightarrow 20^{\circ} \text{C}$), o que parece não ocasionar danos ao espermatozóides quando este se encontra diluído em meio adequado (Moran, 1992). O estresse inicial se dá quando o espermatozóide passa da temperatura corporal para 5°C (Squires et. al. 1999). Isto é devido a fase de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalino, para o estado de gel (Graham, 1996). Para minimizar este efeito é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19° a 8°C e pela adição de lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente (Graham, 1996), além do uso de curvas de resfriamento lentas ($- 0,05^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Se o resfriamento for feito de maneira inadequada, o espermatozóide sofre um fenômeno conhecido como choque-frio (cold shock), a qual induz a danos irreversíveis ao espermatozóide que se caracterizam por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular

ou retrógrado), perda rápida de motilidade, queda do metabolismo e danos na membrana plasmática e no acrossoma (Graham, 1996; Squires, 1999).

2.1.2.2) Processo de criopreservação

Os eventos ocorridos no processo de criopreservação envolvem os seguintes passos: redução da temperatura, desidratação celular, congelação e descongelação (Medeiros et al., 2002a). Estes procedimentos ocasionam danos celulares devido a mudança na temperatura, formação de cristais de gelo, injúrias oxidativas, alterações na membrana do espermatozóide, lesões no DNA, estresse osmótico além da toxicidade dos crioprotetores (Ball & Vo, 2001). A célula espermática parece sensível ao estresse osmótico como também a adição e a remoção de crioprotetores (Watson, 2000; Ball & Vo, 2001).

O processo de congelação de sêmen eqüino envolve inúmeros processos físicos e químicos, que são responsáveis pela manutenção da integridade e viabilidade espermática, assim com a fertilidade de sêmen congelado de eqüino. A água pura se congela e forma cristais de gelo a 0°C, enquanto o ponto de congelação de uma solução é mediado pela concentração de partículas ou soluto que ela contém. Segundo bases físico-químicas, a lesão celular, durante os processos de congelação e descongelação, é causada pela formação de cristais de gelo intracelular que afetam a estrutura da célula, pela concentração de soluto resultante da congelação da água pura e da interação entre estes dois fatores (Graham, 1996).

Se a congelação foi lenta, a descongelação deve também ser lenta para permitir fusão dos cristais de gelo extracelulares. A descongelação destes cristais provoca a diluição dos solutos e lentamente ocorre a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado muito rapidamente, os cristais extracelulares descongelam-

se muito rapidamente e a água do meio invade bruscamente as células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática (Amman e Pickett, 1987; Holt, 2000).

Se o sêmen tiver sido congelado rapidamente, os espermatozóides não terão sofrido desidratação e, portanto, conforme o gelo extracelular derreter, não haverá influxo rápido de água através da membrana celular (Amman e Pickett, 1987). O sêmen congelado rapidamente deve, assim, ser descongelado também rapidamente de modo que o gelo intracelular que se formou durante a congelação não tenha tempo para recrystalizar (Amman e Pickett, 1987; Watson, 1995).

Os efeitos deletérios dos crioprotetores estão relacionados a diversos fatores dentre os quais, o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, indução da fusão da mesma além da inibição da atividade enzimática (Fahy, 1986). Sua toxicidade pode resultar em desnaturação de proteínas e as alterações das interações da actina (Fahy, 1990). O glicerol induz mudanças nos eventos citoplasmáticos por aumentar a viscosidade ao penetrar na célula espermática, causa alterações na polimerização da tubulina, na associação dos microtúbulos, no balanço bioenergético além de atuar diretamente de modo prejudicial na membrana plasmática, no glicocálix e nas proteínas de superfície celular (Hammerstedt & Graham, 1992).

Embora os crioprotetores sejam fundamentais para a sobrevivência dos espermatozóides no processo de congelação, eles podem também, exercer efeitos tóxicos e diminuir as taxas de fertilidade quando presentes em altas concentrações (Rossi et. al, 2003).

A utilização de diversos crioprotetores e suas respectivas combinações podem minimizar e controlar os processos deletérios que ocorrem na célula

espermática durante a congelação e descongelação, possibilitando dessa maneira, resultados mais satisfatórios de motilidade e viabilidade pós-descongelação e conseqüentemente melhores taxas de prenhez (Medeiros et al, 2002b; Rossi et. al, 2003).

Diversos autores relatam a importância da interação dos diluentes de congelação com os crioprotetores (Papa et al., 1998; Arruda, 2000; Alvarenga, 2002; Papa et al., 2002; Neves Neto, 2004), sendo um fator importante na preservação do sêmen eqüino dos danos causados durante a criopreservação.

Zahn et al, (2002), comparando diferentes diluidores observaram resultados melhores e significativos de prenhez (75% sem incorporação e 25% com incorporação de colesterol) quando utilizaram um meio diluidor para congelação de sêmen eqüino denominado MP50 (Papa et al, 2002), com a proporção de crioprotetor contendo 3% de glicerol e 2% de dimetilformamida comparados com diluidor M9 (Papa et al., 1998) o qual continha apenas o glicerol a 5%. Neves Neto (2004) também obteve resultados positivos na manutenção da viabilidade e fertilidade ao utilizar o MP 50, bem como os diluentes BME-adaptado e o FR4 (Palmer et al, 1984).

2.1.3) Crioprotetores

Os crioprotetores devem ser adicionados ao meio para que haja uma proteção do espermatozóide durante a criopreservação e a descongelação (Squires et. al., 1999; Arruda, 2000). São importantes para evitar a formação de gelo intracelular (Medeiros et al., 2002a). Estes componentes são classificados como penetrantes e não penetrantes ou intra e extracelulares (Graham, 1996; Arruda, 2000). Nos protocolos de congelação de sêmen eqüino, o crioprotetor mais usado é

o glicerol (Martin et al, 1979; Loomis et al., 1983; Papa, 1987; Conchran, 1984; Graham, 1996).

Altas concentrações de crioprotetores são deletérias ao espermatozóide devido a sua toxicidade e podem resultar na redução da fertilidade no processo da inseminação artificial. Embora a função destes agentes seja a de minimizar os efeitos negativos, há evidências que o glicerol é tóxico para o espermatozóide. Parte desta toxicidade é devida a injúria bioquímica, resultante da adição direta do crioprotetor sobre componentes subcelulares, apesar de ocorrerem danos osmóticos (Amann & Pickett, 1987; Hammersted & Graham, 1992).

2.1.3.1) Mecanismo de ação

Embora o mecanismo de ação dos crioprotetores não esteja totalmente elucidado acredita-se que os crioprotetores intracelulares atuem através de propriedades de ligação com a água ou por propriedades coligativas (Watson, 1979).

Os crioprotetores extracelulares, por sua vez , protegem através de efeitos osmóticos, ou seja, promovem um meio hipertônico que induz a saída de água das células, levando a desidratação do espermatozóide, reduzindo a probabilidade de se formarem cristais de gelo no interior da célula (Amann & Pickett, 1987).

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

Apesar de imprescindíveis para a sobrevivência dos espermatozóides no processo de congelação, os crioprotetores possuem efeitos tóxicos para o espermatozóide, tornando algumas substâncias utilizadas na criopreservação de outros tipos celulares impróprias para a célula espermática (Watson, 2000). Até mesmo o glicerol deve ser utilizado com restrições devido ao seu efeito citotóxico (Holt, 2000).

2.1.3.2) Crioprotetores não penetrantes

Algumas substâncias, dentre as quais os lipídeos, proteínas e macromoléculas, são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelação sem que para isso necessitem penetrar no espermatozóide, são estes a gema de ovo, leite, alguns açúcares e a albumina sérica bovina (Keith, 1998).

A gema de ovo é rotineiramente utilizada nos diluentes para criopreservação de sêmen de mamíferos com o intuito de proteger contra o choque térmico. Acredita-se que sua ação seja devida à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais aderem a membrana celular durante o processo de congelação, preservando com isso, a membrana do espermatozóide (Moussa et al., 2002), atuando na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolipídeos e aparentemente induzindo a uma alteração transitória de sua composição, consequentemente prevenindo a ruptura da membrana plasmática (Farstard, 1996). Os fosfolipídeos que compõe a fração LDL da gema de ovo protegem o sêmen especificamente durante o processo de resfriamento a 5°C. O uso de fosfatidilserina purificada tem demonstrado proteger as células espermáticas de bode e touros contra o choque térmico. Lipossomas que compõem o colesterol e a fosfatidilserina protegem o espermatozóide de bovinos e garantem os danos do

processo de congelação possivelmente por prevenir das alterações deletérias durante a criopreservação (Wilhelm et al., 1996). Os mesmos autores descreveram que a prevenção conferida pelos lipídeos com relação ao choque térmico parece estar relacionada a quelação do íon Ca^{++} do meio, evitando sua entrada no espermatozóide. É possível que os lipossomas interajam com o cálcio e outros componentes do meio de congelação que afetem a tonicidade ou a fração da água não congelada durante a criopreservação.

Os diluentes usados na criopreservação de sêmen eqüino contêm entre 2 a 20% de gema de ovo. Os espermatozóides bovinos não sobrevivem ao congelação e a descongelação sem a presença de gema de ovo, apesar do glicerol (Keith, 1998).

Os açúcares atuam através da pressão osmótica na desidratação celular, reduzindo a água passível de ser congelada no interior da célula de modo a reduzir a injúria causada pela cristalização de gelo (Aisen et al., 2002). Além de atuarem como crioprotetores, alguns açúcares são substrato energético para o espermatozóide durante a incubação (Yildiz et al., 2000), conferem proteção à membrana plasmática durante a congelação e descongelação através de interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolipídios. Por restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolipídios, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema. Geralmente os dissacarídeos, sacarose e trealose, são os mais efetivos em estabilizar a bicamada do que os monossacarídeos (De Leeuw et al., 1993), mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de

membranas e manutenção de lipídeos numa fase fluida na ausência de água (Anchoroguy et al., 1987; Crowe et al., 1987).

Rafinose tem sido o açúcar mais utilizado na criopreservação de sêmen de ratos com o intuito de promover a hipertonicidade necessária para desidratar a célula antes da congelação (Storey et al., 1998). Seu uso na criopreservação de sêmen eqüino demonstrou melhores resultados quando comparado a sacarose e sugerindo o uso de uma associação glicose-lactose-rafinose (Nagase et al., 1967).

Trealose confere proteção através do efeito osmótico e das interações específicas com os fosfolipídios de membrana (Keith, 1998; Aisen et al., 2002). Atua repondo a água da interface membrana-solução e também demonstra uma interação direta com os grupos polares dos fosfolipídios durante desidratação e congelação reduzindo as interações de “van der Waals” entre as cadeias de hidrocarbonetos (Aisen et al., 2002), com isso estabilizando a membrana (Storey et al., 1998).

O uso de metilcelulose em associação com acetamida, o qual é classificado como intracelular ou penetrante, e trealose na congelação de sêmen de coelhos elevou o número de células móveis após o congelação em relação ao uso isolado da acetamida. O percentual de espermatozóides vivos com o acrossoma intacto também foi maior no diluente contendo metilcelulose e trealose do que somente acetamida, o que demonstra que a combinação de crioprotetores confere uma maior proteção do que apenas a utilização de agentes penetrantes isoladamente e que alguns crioprotetores podem potencializar os efeitos de outros quando associados (Dalimata & Graham, 1997).

O leite vem sendo empregado para diluir e armazenar o sêmen fresco ou resfriado. Ao utilizar um diluente a base de leite, glicose e glicerol na criopreservação

de sêmen eqüino obteve-se um excelente resultado pós-descongelção (McCall e Sorensen (1971).

Alguns aminoácidos como a glutamina, histidina e glicina betaína tem sido utilizados na criopreservação de sêmen de ovinos, garanhões e humanos (Kundu et al., 2001). O uso de L-glutamina a 80mM acrescido ao diluente INRA82 e glicerol melhorou significativamente a motilidade do sêmen de jumento após descongelção, não havendo diferença significativa no grupo controle e nos grupos contendo 160mM e 240mM de glutamina que tiveram seus valores significativamente mais baixos (Trimeche et al., 1996).

2.1.3.3) Crioprotetores penetrantes

A descoberta da ação do glicerol foi de grande importância na criopreservação de sêmen, pois até então este evento não era possível (Keith, 1998; Holt, 2000), sendo atualmente o agente mais utilizado nas espécies mamíferas domésticas (Farstard, 1996).

Apesar de seu mecanismo de ação não se encontrar perfeitamente esclarecido, sabe-se que o glicerol penetra na membrana celular através da difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma (Park & Graham, 1992). Embora a concentração de crioprotetor seja elevada no meio, sua difusão é 30 a 60 vezes menor do que a da água (Graham, 1996). Assim sendo, estas moléculas atravessam a membrana até atingir um equilíbrio, porém a água o faz mais rapidamente ocasionando a desidratação da célula devido a pronta saída de água para diluir a alta concentração externa e somente depois de um período é que o crioprotetor penetra e equilibra as concentrações intra e extracelulares. Nessas condições a água retorna para o interior da célula até atingir um equilíbrio que resulta na retomada do seu tamanho normal (Seidel, 1986).

Além do seu efeito osmótico, o glicerol parece atuar diretamente na membrana plasmática, havendo evidências de que o glicerol se liga aos grupos de cabeça dos fosfolipídios reduzindo a fluidez da membrana, interagindo com ligações protéicas e glicoproteicas da membrana (Parks & Graham, 1992).

O uso do glicerol na criopreservação do sêmen eqüino pode estar relacionado à baixa motilidade pós-descongelação e redução da fertilidade. O efeito tóxico do glicerol tem sido relatado por muitos autores; sua toxicidade parece causar desnaturação das proteínas, alteração nas interações de actina, além de ocasionar mudanças nos eventos citoplasmáticos devido ao aumento da viscosidade pelo glicerol intracelular, modificações na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos, atuação direta na membrana plasmática, alterações no glicocálix e nas proteínas da superfície celular (Hammerstedt & Graham, 1992).

A concentração de glicerol ideal para a sobrevivência do espermatozóide é espécie-dependente, variando de acordo com a curva de congelação, de outros componentes do diluente e ainda do método de envase. Em bovinos a concentração de glicerol varia entre 7 a 9% (Watson,1979), nos suínos (Almlid & Jonhson,1987), 3 a 4%, ovinos (Fiser & Fairfull,1989) ao se fazer uso de pellets obtém-se maior motilidade com o uso de 3 a 4% de glicerol, entre 6 a 8% em se tratando de ampolas, já as palhetas devem conter de 4 a 6% deste crioprotetor. O sêmen de humanos é congelado com 5 a 10 % de glicerol. Em eqüinos ocorre uma grande variação, sendo necessário o uso de um percentual inferior ao utilizado para bovinos (Keith, 1998). Em cães o teor de glicerol varia de 2 a 10% (Farstad, 1996).

Num estudo comparativo entre etilenoglicol e glicerol demonstrou atuação semelhante destes, sendo que quando combinados possibilitam a redução do teor de glicerol, diminuindo o seu efeito tóxico (Alvarenga et al.2000 a). Outro estudo

comparativo do glicerol e outros crioprotetores dentre eles etilenoglicol, dimetilformamida e dimetilsulfóxido utilizando 10 ejaculados de 10 garanhões constatou-se a equivalência no uso dos crioprotetores, com exceção do dimetilsulfóxido o qual apresentou resultado inferior (Alvarenga et al., 2000b).

O uso de sêmen eqüino criopreservado com etilenoglicol associado a um diluente contendo lactose e gema de ovo, resultou em gestação de 3 das cinco éguas do grupo testado (Kotyagina, 1963). Éguas inseminadas com sêmen congelado obtiveram 80 % prenhez tanto com sêmen congelado com glicerol como com etilenoglicol (Rombe et al., 1965). Através destes resultados concluiu-se que o etilenoglicol pode se usado na criopreservação do espermatozóide eqüino, uma vez que não interfere na sua fertilidade (Rombe et al., 1965).

Dimetilsulfóxido é rotineiramente utilizado como crioprotetor, uma vez que penetra rapidamente na membrana plasmática. Para que um soluto atue desta maneira, é necessário que seja solúvel à membrana, assim como em água. Apresenta como inconveniente à capacidade de causar alterações na membrana, as quais danificam e inviabilizam as células, caracterizando os crioprotetores penetrantes geralmente como tóxicos para as células (Wolfe & Bryant, 2001).

Tanto isoladamente como em associação com o glicerol, o dimetilsulfóxido aumenta a motilidade pós-descongelação do sêmen bovino. A combinação de ambos para o sêmen canino tem sido efetuada com êxito. Em células espermáticas de peixe, o dimetilsulfóxido é usado em teores acima de 12,5%. Com relação a espécie eqüina, ao ser adicionado em concentrações entre 1 a 9% em um diluente contendo lactose, gema de ovo e citrato, combinado ou não com o glicerol, apresenta maior viabilidade espermática pós descongelação quando congelado com 5% de dimetilsulfóxido, sendo este protocolo superior ao do uso isolado de glicerol

(Keith, 1998). Em coelhos os resultados não apenas de motilidade, como também de fertilidade têm sido alcançados através de crioprotetores como o dimetilsulfóxido, etilenoglicol e amidas (Dalimata & Graham, 1997).

Dimetilacetamida e o dimetilsulfóxido têm sido uma alternativa na criopreservação de sêmen por não apresentar os efeitos tóxicos do glicerol (Blanco et al., 2000), sendo estes usados para congelar sêmen de peixe, como também o glicerol, metanol e o propilenoglicol (Baunly et al., 1999). A dimetil acetamida apresentou resultados superiores quando comparada ao glicerol ou ao dimetilsulfóxido na congelação de espermatozóides de aves, obtendo o mesmo resultado para células espermáticas de truta, além da fertilidade e da viabilidade serem superiores quando comparadas com o glicerol e o dimetilsulfóxido (Keith, 1998).

A utilização de dimetilformamida (5%), metilformamida (5%) e dimetilacetamida (3 e 5%) melhoraram os parâmetros espermáticos quando comparado ao glicerol e a dimetilacetamida 1%. A motilidade total foi superior nos diluentes contendo dimetilformamida e a motilidade progressiva foi superior para a maioria dos garanhões quando o sêmen foi congelado com metilformamida e dimetilacetamida (3%) (Medeiros et al., 2002b).

Dimetilformamida e metilformamida são crioprotetores que vem sendo utilizados com grande sucesso na congelação de sêmen eqüino. Seu uso para congelação de sêmen de garanhões com boa congelabilidade não proporciona aumento da motilidade e sim resultados semelhantes ao glicerol (Keith, 1998). No entanto, a utilização desses agentes em garanhões com baixa resistência ao processo de criopreservação manifesta melhores resultados quando comparados com o glicerol (Gomes et al. 2002).

O uso combinado de crioprotetores confere maior proteção em relação ao seu uso isolado (Dalimata & Graham, 1997). Assim sendo, a associação da dimetilformamida e do glicerol, conforme a composição do meio diluidor MP50 (Papa et al.2002), proporcionou uma melhor proteção da célula espermática durante a congelação, pois além da obtenção de excelentes resultados laboratoriais pós-descongelação resultou índices de fertilidade superiores aos descritos na literatura. Este diluente combina os dois agentes crioprotetores e enriquecido com açúcares e substratos de cultivo celular e macromoléculas, além da presença de gema de ovo e leite desnatado. A associação destes componentes, da dimetilformamida e glicerol é extremamente favorável a proteção do espermatozóide eqüino durante o processo de congelação (Papa et al., 2002).

2.2) Métodos de avaliação dos parâmetros espermáticos

2.2.1) Motilidade espermática

A análise da motilidade espermática é um parâmetro útil na avaliação da viabilidade espermática. O uso de um analisador computadorizado (HTMA) é uma alternativa promissora à tradicional avaliação microscópica da motilidade e concentração espermáticas, que já vem sendo empregada para determinar as características de sêmen eqüino, permitindo uma avaliação precisa da motilidade e trajetórias individuais (Ferreira, 2000). Arruda (2000) observou que a acurácia da análise computadorizada ao avaliar o efeito de diferentes diluentes e crioprotetores.

A motilidade é necessária para a penetração na junção útero-tubárica, liberação dos sítios de armazenamento espermático no oviduto e penetração através das células que circundam o ovócito (Amann, 1989) e pode estar comprometida se as mitocôndrias estiverem afuncionais, se a membrana plasmática estiver lesada, se

o espermatozóide tiver sofrido choque-frio ou se estiver morfologicamente anormal (Kirk, 2001).

2.2.2) Integridade da membrana plasmática

A associação carboxifluoresceína (CFDA) com o iodeto de propídeo (IP), foi proposta por Harrison & Vickers (1990) para a avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozóides de ovinos e suínos através de microscopia óptica de fluorescência.

A carboxifluoresceína devido ao seu baixo peso molecular, atravessa rapidamente a membrana plasmática local, onde sofre um processo de hidrolização para ser transformada em carboxifluoresceína livre, a qual apresenta como característica fluorescência esverdeada. A permanência da carboxifluoresceína no interior da célula espermática está condicionada a membrana estar intacta. O corante iodeto de propídeo se liga ao DNA e RNA quando existe alguma lesão na membrana emitindo fluorescência avermelhada. ZÚCCARI (1998), trabalhando com fluorocromos CFDA e IP, observou em sêmen congelado de garanhões uma boa correlação entre a perda de motilidade durante incubação com aumento do percentual de membranas lesadas.

3)Fertilidade com sêmen congelado

Em relação aos índices de fertilidade com o uso de sêmen congelado, os mesmos apresentam grande variação, devido à variabilidade entre as diferentes raças, garanhões, ejaculados do mesmo garanhão, técnicas de inseminação, extensores, dose inseminante, número de inseminações e crioprotetores, o que torna difícil comparar os resultados dos diferentes autores. Para melhor visualização, os dados foram dispostos nas tabelas A e B.

Uma nova técnica de congelação de sêmen, a qual viabiliza a criopreservação de sêmen refrigerado, foi proposta (Crockett et al., 2000; Backman et al., 2004). Estes autores observaram que a congelação após 24 horas de refrigeração resultou na redução da motilidade progressiva (Crockett et al., 2000), no entanto, a congelação de sêmen refrigerado por 18 horas não afetou a viabilidade e fertilidade (Backman et al., 2004).

Tabela A: Resultados de fertilidade com sêmen congelado (Dados nacionais)

Autor(es)	Metodologia	Nº sptz	IA	Fertilidade
Arruda et al. (1986) apud Neves Neto (2004)		400 a 500x10 ⁶	Intracornual	66,7%
Papa (1987)	macrotubo	400x10 ⁶	corpo útero	52%
Leão, (2002)	palheta 0,5mL palheta 0,5mL	400x10 ⁶ 10x10 ⁶	corpo útero endoscopia	0% 33,33%
Gomes, (2002)	palheta 0,5mL palheta 0,5mL	40x10 ⁶ 40x10 ⁶	Corpo útero papila	30% 66,6%
Zahn,F.S. (2002)	palheta 0,5mL palheta 0,5mL	400x10 ⁶ 400x10 ⁶	corpo útero corpo útero	75% s/ ch* 25% c/ch
Dell'Aqua Jr (2000)	palheta 0,5mL	150x10 ⁶	corpo útero	40%(pré/pós)
	palheta 0,5mL palheta 0,5mL	150x10 ⁶ 800x10 ⁶	ápice corno corpo útero	50%(pré/pós) 20% (pós)
	palheta 0,5mL palheta 0,25mL	400/400 x10 ⁶ 50x10 ⁶	corpo útero corpo útero	30%(pré/pós) 40% (pós)
	palheta 0,25mL palheta 0,25mL	50x10 ⁶ 50x10 ⁶	ápice corno corpo útero	0,0% (pré) 20,0% (pós)
Medeiros (2003)	palheta 0,5mL	800x10 ⁶	corpo útero	0,0% glicerol
	palheta 0,5mL	800x10 ⁶	corpo útero	40,0% DF
Neves Neto, J.R. (1999)	palheta 0,5mL	800x10 ⁶	corpo útero	40,0% Merck
	palheta 0,5mL	800x10 ⁶	corpo útero	53,3% M9
Neves Neto, J.R. (2004)	palheta 0,5mL palheta 0,5mL palheta 0,5mL	400/400 x10 ⁶ 400/400 x10 ⁶ 400/400 x10 ⁶	ápice corno ápice corno ápice corno	45,0% BME 60,0% MP 50 40,0% FR4

* colesterol

Tabela B: Resultados de fertilidade com sêmen congelado (Dados internacionais)**

Autor(es)	Metodologia	Nº spz/palheta	IA	Fertilidade
Muller (1982)	15mL	Não relatado	1 tubo alum	52%
Love (1989)	10-12mL	1000-1200 x10 ⁶	1 tubo alum	55%
Nagase (1967)	0,3mL	Não relatado	10-30 pellets	33%
Bader (1968)	pellet	Não relatado	Não relatado	39%
Klug (1975)	pellet	Não relatado	18-33 pellets	27%
Merkt (1975)	pellet	Não relatado	30 pellets	60%
Naumenkov (1979)	0,2mL	Não relatado	pellet	53%
Braun (1990)	pellet	Não relatado	1 pellet	0%
Ellery (1971)	Sache plástico	Não relatado	1 saché	41%
Baczynski (1973)	Ampola	Não relatado	Não relatado	4%
Tischner (1975)	2,5mL	400-700 x10 ⁶	2-4 ampolas	26%
Loomis (1983)	palheta 0,5mL	250x10 ⁶	1 palheta	29%
Cristanelli (1984)	palheta 0,5mL	385 x10 ⁶	1 palheta	56%
Volkman (1987)	palheta 0,5mL	325 x10 ⁶	1 palheta	44%
Volkman (1987)	palheta 0,5mL	325 x10 ⁶	2 palheta	73%
Haard (1991)	palheta 0,5mL	500 x10 ⁶	1 palheta	60%
Jasko (1992)	palheta 0,5mL	800x10 ⁶	1 palheta	56%
Thomassen (1993)	palheta 0,5mL	150x10 ⁶	7 palheta	43%
Heitland (1995)	palheta 0,5mL	200x 10 ⁶	4 palheta	17% e 50%
Nishikawa (1975)	palheta 1,0mL	75-150x10 ⁶	3-5 palhetas	56%
Cochran (1983)	palheta 1,0mL	250 x10 ⁶	1 palheta	28%
Samper (1991)	palheta 2,5mL	200 x10 ⁶	1 palheta	51%
Samper (1994)	palheta 2,5mL	200 x10 ⁶	1 palheta	38%
Martin (1979)	palheta 4,0mL	200-400 x10 ⁶	1 palheta	63%
Kloppe (1988)	palheta 4,0mL	600 x10 ⁶	1 palheta	60%
Love (1989)	palheta 4,0mL	400 x10 ⁶	1 palheta	46%
Tischner (1979)	20-25mL	300 x10 ⁶	1 tubo alum.	32%
Naumenkov (1979)	25mL	Não relatado	1 tubo alum	62%

** adaptado de Squires et al.(1998)

Material e Método

4) MATERIAL E MÉTODO

4.1) Experimento I: *Comparação entre as metodologias de congelação de sêmen*

O presente experimento comparou duas metodologias de congelação de sêmen eqüino: protocolo de congelação rotineiramente utilizado em no Laboratório de Andrologia UNESP – Botucatu (Papa et al., 2002) e o congelação de sêmen após 24 horas de refrigeração (Fig1).

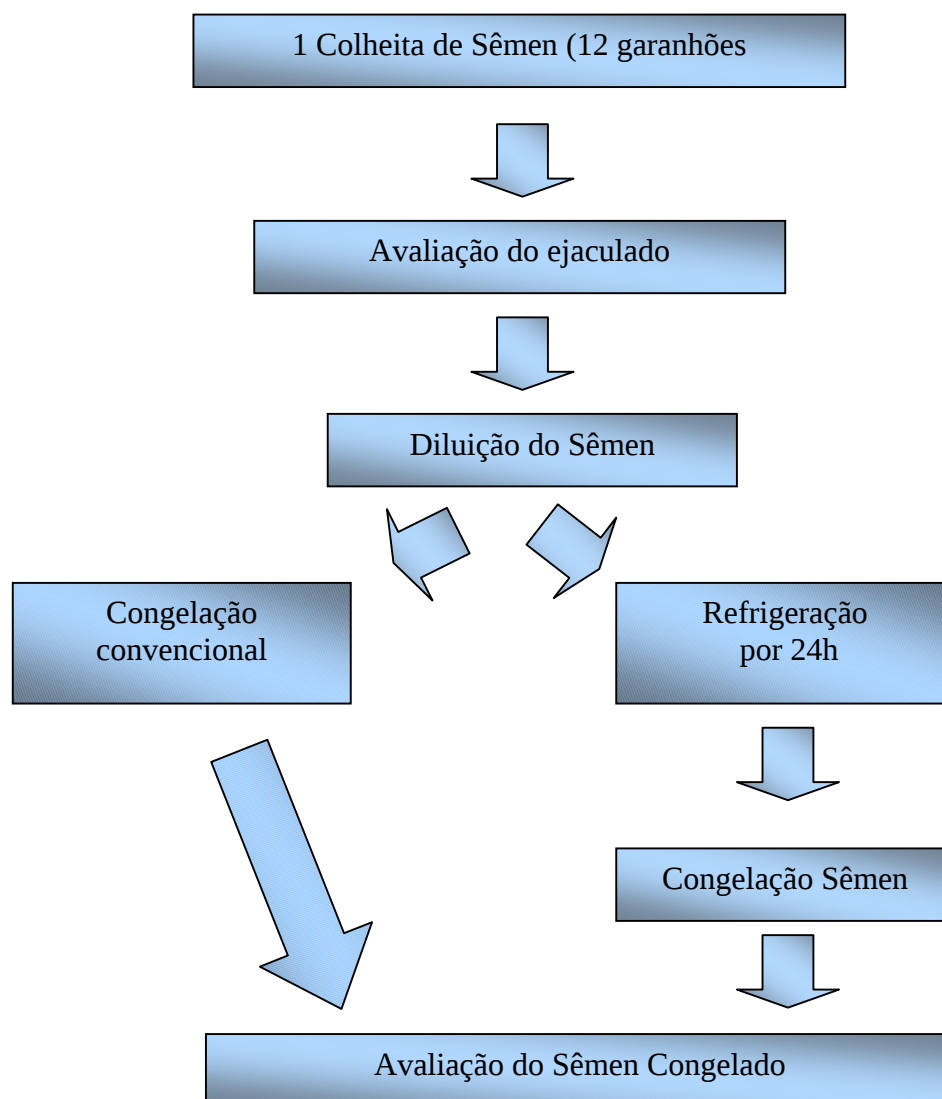


Fig 1: Organograma do processamento do ejaculado no Experimento I

4.1.1) Animais

- Garanhões

Foram utilizados 12 garanhões, com idades entre 3 e 18 anos, das raças: Westfallen, Puro Sangue Árabe, Hanoveriano e Paint Horse, sendo 4 pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ) e Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária-FMVZ-UNESP/Botucatu e 8 das raças Holsteiner e Westfallen pertencentes ao Centro Hípico Agromen. Utilizou-se um ejaculado de cada garanhão.

4.1.2) Colheita de sêmen

A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial modelo “Botucatu” (Papa & Alvarenga, 1987), composta por um tubo rígido de PVC, mucosa de látex, mucosa plástica descartável e acoplada a um recipiente contendo uma camisa sanitária descartável e um copo coletor isotérmico revestido de camisa sanitária descartável. A metodologia empregada foi a colheita fechada e a temperatura da vagina artificial em torno de 45°C.

4.1.3) Análises laboratoriais

O sêmen foi filtrado em um Becker com o auxílio de um filtro de nylon e o volume do ejaculado aferido em proveta graduada. Em seguida, uma avaliação macroscópica foi realizada, na qual analisou-se o odor, a cor e aspecto.

Posteriormente, uma alíquota de 2mL foi separada para avaliação do sêmen “in natura” e o restante diluído na proporção de 1:1 com diluente K75 (Macedo, 2005) até que fossem realizadas as análises laboratoriais. A motilidade total foi avaliada em microscópio de contraste de fase (Olympus, modelo CHK2-F (200X)).¹

¹ Olympus Optical CO, LTDA

A determinação da concentração espermática foi realizada em microscópio de luz com contraste de fase (200X), com auxílio de uma câmara hematómetrica (Neubauer) após diluição de 1:20 (1 gota de sêmen : 19 gotas de água destilada). O pH foi mensurado com auxílio de pHmetro² e a osmolaridade pelo osmômetro³.

A avaliação da integridade de membrana foi analisada pelo método de epifluorescência⁴ de acordo com a metodologia descrita por Harrison & Vickers (1990) e modificada por Zúccari (1998).

4.1.4) Processamento das amostras

Os ejaculados foram divididos em 02 partes sendo uma reservada para o congelamento convencional (Metodologia Convencional) e a outra diluída na proporção de 2:1 (diluyente:sêmen) com extensor a base de leite-glicose-lactose (Botu-Semen®)⁵ e armazenado no Equitainer®⁶ durante o período de 24 horas (Metodologia Equitainer).

4.1.4.1) Metodologia convencional

As amostras de sêmen previamente diluídas em meio comercial Botu-Semen® na proporção 1:1 foram centrifugadas a 600xg por dez minutos; em seguida os “pellets” foram ressuspensos com o meio Botu-Crio®⁵ contendo 3% de glicerol⁷ + 2% dimetilformamida⁸, na concentração de 200×10^6

² Micronal S.A., São Paulo

³ Precision Systems, Inc., MA, USA

⁴ Leica Microsystems- DMLB- Alemanha

⁵ Biotech Botucatu / ME LTDA

⁶ Hamilton-Thorne Research Beverly, MA, EUA

⁷ Merck

⁸ Sigma Aldrich - 4551

espermatozóides/mL. O sêmen foi envasado em palhetas francesas de 0,5 mL e mantidas em estabilização a 5°C por 20 minutos em refrigerador comercial Minitüb⁹, seguida de estabilização em vapor de nitrogênio por 20 minutos à 6cm da coluna líquida, imersas e posterior armazenamento em botijões de nitrogênio a - 196°C.

4.1.4.2) Metodologia Equitainer

Previamente ao processamento das amostras, o laboratório foi climatizado a temperatura de 20°C. As amostras eram retiradas do Equitainer[®] (temperatura média de 8°C após 24h) e submetidas à centrifugação 600xg por dez minutos. Os pellets foram ressuspensos com Botu-Crio[®] à 20°C. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL as quais foram submetidas aos mesmos procedimentos descritos para a Metodologia Convencional.

4.1.5) Descongelação do Sêmen

As palhetas foram descongeladas em banho-maria, a 46°C por 20 segundos, segundo técnica descrita por Papa & Dell'Aqua Jr (2001).

Após descongeladas, os parâmetros espermáticos foram avaliados através da análise computadorizada da motilidade (CASA - Hamilton Thorn – HTM-IVOS 10 – Anexo I)¹⁰ e a integridade de membrana pelo uso de sondas fluorescentes (Zúccari, 1998).

⁹ Conservadora de sêmen c/ termômetro digital e temp.programável- 60 L -Minitüb-Porto Alegre-RS

¹⁰ Hamilton-Thorne Research Beverly, MA, EUA

4.2) EXPERIMENTO II: Estudo da congelação de sêmen utilizando-se diferentes crioprotetores após refrigeração em dois sistemas

O presente experimento objetivou comparar diferentes sistemas de refrigeração rotineiramente utilizados no transporte de sêmen refrigerado, bem como comparar diferentes crioprotetores alternativos e temperaturas de adição do diluente de congelação após a centrifugação, conforme descrito na figura 2.

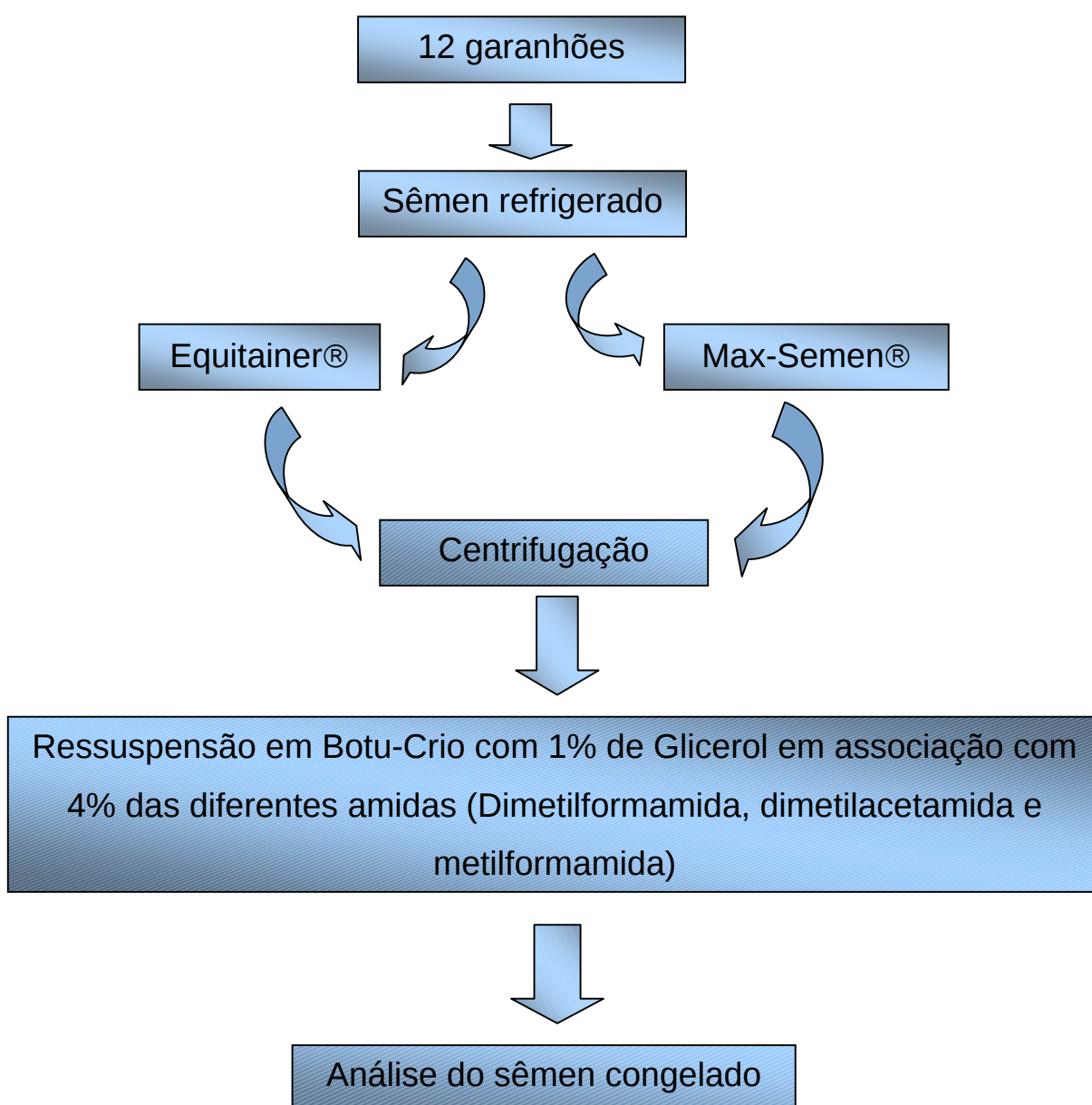


Fig 2: Organograma do processamento das amostras pertencentes ao Experimento II

4.2.1) Animais

Foram utilizados 05 ejaculados de cada um dos 4 garanhões pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (CERBEQ) e Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária/FMVZ-**UNESP/Botucatu** e um ejaculado de 8 garanhões, das raças Holsteiner e Westfallen pertencentes ao Centro Hípico Agromen.

4.2.2) Colheita de sêmen

Os ejaculados foram obtidos conforme descrito no item 4.1.2 do *Experimento I*.

4.2.3) Análises laboratoriais

As amostras de sêmen foram avaliadas macroscopicamente e microscopicamente conforme o item 4.1.3 do *Experimento I*.

4.2.4) Processamento das amostras

Os ejaculados foram divididos em 02 alíquotas e diluídas na proporção de 2:1 (diluyente:sêmen) utilizando diluyente a base de leite-glicose-lactose (Botu-Semen®). As amostras foram armazenadas no Equitainer® e num sistema de armazenamento composto de caixa de isopor com uma fonte de gelo reciclável (Max-Semen Express®)¹¹, por um período de 24h de refrigeração e armazenamento, tempo suficiente para o transporte das amostras de diferentes regiões do Brasil até o laboratório para a manipulação do mesmo, utilizando como meio de transporte o avião.

Imediatamente após o período de armazenamento e refrigeração as amostras permaneceram no laboratório e foram submetidas à centrifugação e criopreservadas de acordo com seguinte tratamento:

¹¹ Agrofarma

- Amostras ressuspendidas com o diluente Botu-Crio® à **20°C**, acrescido de 4% dos seguintes crioprotetores: dimetilacetamida¹² (a) ou dimetilformamida (b) ou metilformamida¹³ (c) acrescidos de 1% de glicerol

As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5mL e submetidas ao processo de congelação de acordo com Papa et al. (2002). A descongelação das amostras foi realizada através da imersão das palhetas em banho-maria à 46°C/ 20" conforme metodologia desenvolvida por Dell'Aqua Jr. et al.(2001). A motilidade e a integridade de membrana foram avaliadas tanto previa como posteriormente a criopreservação através da análise computadorizada da motilidade - CASA (Ferreira, 2000) e uso de sondas fluorescentes, respectivamente (Zúccari,1998).

4.3) Teste de Fertilidade

Foram utilizadas 10 éguas com idade variando entre 5 e 16 anos, de fertilidade conhecida e dois garanhões com fertilidade comprovada, sendo um da raça Puro Sangue Árabe e outro da raça Westfallen com 18 e 6 anos de idade, respectivamente.

4.3.1) Congelação da amostras de sêmen

Para o teste de fertilidade foi selecionada a melhor combinação obtida no experimento II, ou seja, armazenamento e refrigeração em Equitainer® previamente a congelação, a associação dos crioprotetores de glicerol (1%) + metilformamida (4%) e adição do extensor Botu-Crio® à 20°C.

Os ejaculados dos garanhões Árabe e Westfallen foram divididos em duas alíquotas: uma submetida ao congelação convencional e a outra refrigerada em Equitainer® por 24h e então congeladas, conforme descrito no item 4.1.4.

¹² D 5511-Sigma Aldrich

¹³ M 2769 – Sigma Aldrich

4.3.2) Análise das amostras descongeladas

As amostras foram descongeladas e os parâmetros espermáticos analisados de acordo com o item 4.1.5.

4.3.3) Éguas

Foram selecionadas 10 éguas mestiças, com idade entre 5 e 16 anos, mantidas no CERBEQ – Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina (Posto de Monta), localizado na Fazenda Lageado, pertencente ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Unesp Campus de Botucatu- (SP). Todas as éguas foram consideradas aptas após exame clínico e reprodutivo.

As éguas foram mantidas em piquetes com *Brachiaria decumbens*, recebendo água *ad libitum* e alimentadas com feno de Coast-Cross (*Cynodon dactylon*) e ração Purina.

4.3.3.1) Controle do desenvolvimento folicular e indução da ovulação

As éguas foram rufiadas diariamente e monitoradas através da palpação retal e exame ultra-sonográfico, para acompanhamento do desenvolvimento folicular. Após a detecção de um folículo de 35 mm associado à presença de edema uterino através do ultra-som, a ovulação foi induzida com 10mg de extrato de pituitária equina.

Simultaneamente a indução da ovulação, o ambiente uterino foi preparado para a inseminação através da infusão de 60mL de sangue homólogo total colhido por venopunção com 0,5mL de Heparina Sódica (Parinex – 5000UI/mL). Foram administradas 10 UI/IM de ocitocina 12 horas após a infusão de sangue total. O procedimento foi repetido 6 horas após a última inseminação artificial.

4.3.3.2) Inseminação Artificial

As éguas foram inseminadas com a dose inseminante de 350×10^6 espermatozóides viáveis totais. Duas inseminações foram realizadas sendo a primeira 30 horas após a indução da ovulação e a segunda até 8 horas a partir da primeira. Foram descartadas as éguas com intervalo entre inseminações superior a 8h, uma vez que o protocolo de inseminações preconizava apenas duas inseminações. As éguas foram distribuídas aleatoriamente e utilizadas nos dois grupos testados. Para o procedimento de inseminação, utilizou-se uma pipeta flexível (Minitüb®)¹² e o sêmen foi depositado no ápice do corno ipsilateral à ovulação.

4.3.6) Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado 15 dias após a detecção da ovulação, por meio de ultra-sonografia.

4.4) Análise estatística

A análise estatística dos dados do trabalho foram realizadas pelo Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências desta Universidade.

- Experimento I:

Para cada variável avaliada no experimento, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de um delineamento em blocos, sendo cada animal considerado um bloco, e com os tratamentos no esquema fatorial com os fatores: congelamento convencional e pós 24 horas de refrigeração.

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

- Experimento II:

¹² Minitüb do Brasil Ltda

Idem ao item anterior, no entanto, os fatores considerados foram:

- Sistema (Caixa e Equitainer)
- Congelação (Pré e Pós)
- Crioprotetores (DA, DF e MF)

Para o teste de fertilidade entre os sistemas de congelação envolvendo dois garanhões, foi utilizada a análise de variância de um delineamento ao acaso com os fatores:

- Congelação (convencional e pós 24 horas de refrigeração)
- Garanhão (A e B)

Para o teste de fertilidade foi utilizado o teste estatístico de McNemar (ZAR, 1996) para comparação de proporções em amostras dependentes.

Resultados

5) RESULTADOS

5.1) EXPERIMENTO I:

Comparação entre duas metodologias de congelação: convencional vs congelamento após 24h de refrigeração

Entre as metodologias de avaliadas não houve diferença para a motilidade total, bem como para motilidade progressiva. No entanto, quando avaliada a integridade de membrana pelo método de fluorescência, observou-se a superioridade da metodologia convencional em relação a congelação após 24 horas de refrigeração em Equitainer®. Os parâmetros avaliados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Médias e desvios padrão (%) das características espermáticas avaliadas: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e integridade de membrana plasmática (MP) segundo metodologia de congelação

Metodologia	VARIÁVEIS AVALIADAS		
	MT	MP	MP
Convencional (Papa et al, 2002)	68,9 ± 5,87 ^A	31,6 ± 6,48 ^A	56,2 ± 8,02 ^A
Pós 24h refrigeração	65,8 ± 5,72 ^A	28,8 ± 7,91 ^A	46,7 ± 6,70 ^B

Para as variáveis avaliadas, médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente (p>0,05).

5.2) EXPERIMENTO II: Estudo da congelação de sêmen utilizando-se diferentes crioprotetores após refrigeração em dois sistemas

Os valores da motilidade total foram semelhantes para os sistemas de refrigeração Max-Semen Express® e para o Equitainer® no momento pré-congelação ($p>0,05$), porém no momento pós-congelação Equitainer® apresentou porcentagem de motilidade total foi superior ao Max-Semen Express®, conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Médias e desvios padrão em % da Motilidade Total segundo sistema de refrigeração, independente do crioprotetor

Congelação - momento	SISTEMA	
	Max-Semen Express®	Equitainer
Pré	78,3 ± 7,55 ^A	78,9 ± 6,25 ^A
Pós	58,1 ± 11,52 ^A	62,2 ± 10,42 ^B

Letras maiúsculas: comparam médias de sistemas em cada momento da metodologia da congelação.

Quanto ao sistema de refrigeração não foi observada diferença na motilidade total ($p>0,05$). Com relação aos crioprotetores utilizados, tanto no Max-Semen Express® como no Equitainer®, a metilformamida apresentou valores superiores para motilidade total em comparação com a dimetilacetamida ($p<0,05$). Não houve diferença entre dimetilacetamida e dimetilformamida ($p>0,05$). Os dados encontram-se na tabela 3.

Tabela 3: Médias e desvios padrão da Motilidade Total em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente da metodologia de congelação

CRIOPROTETORES			
Sistema	DA	DF	MF
Max-Semen Express®	66,2 ±16,00 ^{Aa}	67,3±12,95 ^{ABa}	71,2± 13,13 ^{Ba}
Equitainer	66,7±13,01 ^{Aa}	71,3±9,48 ^{ABa}	73,7 ±12,53 ^{Ba}

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada sistema de refrigeração.
Letras minúsculas: comparam médias de sistemas de refrigeração para cada crioprotetor.

Quando foram testados os crioprotetores em relação ao momento pré e pós-congelação, a metilformamida apresentou valores de motilidade total superiores aos da dimetilacetamida ($p < 0,05$) em ambos os momentos. Não houve diferença entre metilformamida e a dimetilformamida ($p > 0,05$), bem como entre dimetilformamida e dimetilacetamida ($p > 0,05$) conforme a tabela 4.

Tabela 4: Médias e desvios padrão da Motilidade Total em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração

CRIOPROTETORES			
Congelamento - momento	DA	DF	MF
Pré	76,2± 8,01 ^A	77,4± 5,52 ^A	82,2± 5,51 ^B
Pós	56,7±12,72 ^A	61,2±9,93 ^{AB}	62,6±10,03 ^B

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada momento da metodologia de congelação.

Em relação a motilidade progressiva, observou-se a superioridade do Equitainer sobre o Max-Semen Express® no momento pós-congelação ($p < 0,05$), conforme demonstrado na tabela 5.

Tabela 5: Médias e desvios padrão da Motilidade Progressiva em % segundo sistema de refrigeração, independente do crioprotetor

Momento	Sistema	
	Max-Semen Express®	Equitainer
Pré	$27,3 \pm 9,60^A$	$26,8 \pm 6,25^A$
Pós	$22,6 \pm 7,90^A$	$26,7 \pm 9,50^B$

Letras maiúsculas: comparam médias de sistema de refrigeração em cada momento da metodologia de congelação.

A motilidade progressiva, em ambos os sistemas, quando foi utilizada a metilformamida (MF) apresentou melhores resultados aos demais crioprotetores ($p < 0,05$), porém não houve diferença entre a dimetilacetamida (DA) e dimetilformamida (DF) ($p > 0,05$), conforme observado na tabela 6.

Tabela 6: Médias e desvios padrão da Motilidade Progressiva em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente do momento da metodologia de congelação

CRIOPROTETORES			
Sistema	DA	DF	MF
Max-Semen Express®	21,9 ±8,44 ^{Aa}	22,3±7,20 ^{Aa}	30,7± 8,72 ^{Ba}
Equitainer	21,9±7,12 ^{Aa}	23,7±5,20 ^{Aa}	34,7 ±8,6 ^{Bb}

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetor em cada sistema de refrigeração.
Letras minúsculas: comparam médias de sistema de refrigeração para cada crioprotetor.

Nos momentos pré e pós-congelação os crioprotetores dimetilformamida e dimetilacetamida foram semelhantes ($p>0,05$), no entanto, a metilformamida foi superior aos demais ($p<0,05$). Os dados encontram-se dispostos na tabela 7.

Tabela 7: Médias e desvios padrão da Motilidade Progressiva em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração

CRIOPROTETORES			
Momento	DA	DF	MF
Pré	24,2±7,52 ^A	22,5±5,64 ^A	34,6±8,66 ^B
Pós	19,6±7,40 ^A	23,5±6,90 ^A	30,9±8,70 ^B

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada momento da metodologia de congelação.

O parâmetro VCL (velocidade real do espermatozóide) medida em μ/s pelo HTMA não foi influenciado pelo uso de diferentes sistemas tanto no momento pré, como no pós-congelação, conforme observado na tabela 8.

Tabela 8: Médias e desvios padrão do VCL (velocidade real) em $\mu m/s$ segundo sistema de refrigeração e momento da metodologia de congelação, independente do crioprotetor

SISTEMA		
Congelação	Caixa	Equitainer
Pré	207,8 $\pm$ 22,87 ^A	210,0 $\pm$ 18,66 ^A
Pós	173,6 $\pm$ 19,71 ^A	177,4 $\pm$ 18,02 ^A

Letras maiúsculas: comparam médias de sistemas em cada momento da metodologia de congelação.

Quando avaliada a velocidade real do espermatozóide (VCL), os crioprotetores não diferiram quando o sistema de transporte utilizado foi o Max-Semen Express[®] ($p > 0,05$), no entanto, a dimetilformamida e a metilformamida foram superiores a dimetilacetamida quando foi utilizado o Equitainer[®] como sistema de refrigeração pré-congelação ($p < 0,05$). Em relação aos momentos pré e pós-congelação, tanto a metilformamida quanto a dimetilformamida foram superiores a dimetilacetamida ($p < 0,05$), conforme descrito nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Médias e desvios padrão do VCL (velocidade real) em $\mu\text{m/s}$, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente da metodologia de congelação

CRIOPROTETORES			
Sistema	DA	DF	MF
Max-Semen Express®	185,8 $\pm$ 26,26 ^{Aa}	193,6 $\pm$ 26,72 ^{Aa}	192,7 $\pm$ 29,48 ^{Aa}
Equitainer	184,4 $\pm$ 23,34 ^{Aa}	200,3 $\pm$ 22,48 ^{Ba}	196,5 $\pm$ 25,83 ^{Ba}

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada sistema de refrigeração.

Letras minúsculas: comparam médias de sistemas de refrigeração para cada crioprotetor.

Tabela 10: Médias e desvios padrão do VCL (velocidade real) em $\mu\text{m/s}$, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração

CRIOPROTETORES			
Congelação - momento	DA	DF	MF
Pré	200,1 $\pm$ 19,45 ^A	212,9 $\pm$ 20,97 ^B	213,8 $\pm$ 19,76 ^B
Pós	170,1 $\pm$ 19,65 ^A	181,2 $\pm$ 16,50 ^B	175,3 $\pm$ 19,43 ^{AB}

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada momento da metodologia de congelação.

Em relação ao índice progressivo (STR), o mesmo não foi influenciado pelo sistema de refrigeração, nos momento pré e pós-congelação ($p > 0,05$). Os dados estão descritos na tabela 11.

Tabela 11: Médias e desvios padrão da STR (índice progressivo) em % segundo sistema de refrigeração, independente de crioprotetor

Congelação	SISTEMA	
	Caixa	Equitainer
Pré	70,6 ± 5,06 ^A	69,8 ± 4,85 ^A
Pós	76,6 ± 4,89 ^A	76,9 ± 4,13 ^A

Letras maiúsculas: comparam médias de sistemas de refrigeração em cada momento da metodologia de congelação.

À avaliação do STR, com o uso do Equitainer[®] a metilformamida foi superior a dimetilformamida e a dimetilacetamida nos momentos pré e pós-congelação ($p < 0,05$). No mesmo sistema, o crioprotetor dimetilformamida foi superior a dimetilacetamida ($p < 0,05$), porém não diferiram quando a refrigeração foi realizada no Max-Semen Express[®] ($p > 0,05$). No momento pós-congelação, os crioprotetores dimetilacetamida e dimetilformamida foram iguais ($p > 0,05$), entretanto, no momento pré-congelação o crioprotetor dimetilformamida foi superior a dimetilacetamida ($p < 0,05$). Os valores de STR para os crioprotetores nos diferentes sistemas, e dos crioprotetores nos momentos pré e pós-congelação estão descritos nas tabelas 12 e 13 respectivamente.

Tabela 12: Médias e desvios padrão da STR (índice progressivo) em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente do momento da metodologia de congelação

CRIOPROTETORES			
Sistema	DA	DF	MF
Max-Semen Express®	73,1 ±4,74 ^{Aa}	71,7±5,96 ^{Aa}	75,9± 5,99 ^{Ba}
Equitainer	72,9±5,14 ^{Aa}	70,4±4,92 ^{Ba}	76,7 ±5,44 ^{Ca}

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada sistema de refrigeração.
Letras minúsculas: comparam médias de sistemas de refrigeração para cada crioprotetor.

Tabela 13: Médias e desvios padrão da STR (índice progressivo) em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração

CRIOPROTETORES			
Momento	DA	DF	MF
Pré	70,2±4,38 ^A	67,5±4,47 ^B	72,9±4,54 ^C
Pós	75,8±3,63 ^A	74,7±3,7 ^A	79,70±4,70 ^B

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada momento da metodologia de congelação.

A linearidade (LIN) não foi influenciada pelo sistema de refrigeração utilizado ($p>0,05$), conforme descrito na tabela 14.

Tabela 14: Médias e desvios padrão da LIN em %, segundo sistema de refrigeração, independente do crioprotetor:

Congelamento - momento	Sistema	
	Max-Semen Express®	Equitainer
Pré	38,3 ± 3,38 ^A	38,2 ± 3,50 ^A
Pós	41,4 ± 4,10 ^A	42,3 ± 3,99 ^A

Letras maiúsculas: comparam médias de sistemas em cada momento da metodologia de congelamento.

Quando o parâmetro avaliado foi a linearidade o crioprotetor metilformamida foi superior a dimetilformamida e a dimetilacetamida ($p < 0,05$), em ambos sistemas de refrigeração (tabela 15). Porém, a dimetilformamida e a dimetilacetamida não diferiram ($p > 0,05$). O mesmo foi observado nos momentos pré e pós-congelamento (tabela 16).

Tabela 15: Médias e desvios padrão da LIN em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente do momento da metodologia de congelamento

Sistema	CRIOPROTETORES		
	DA	DF	MF
Max-Semen Express®	38,5 ± 3,13 ^{Aa}	38,6 ± 3,50 ^{Aa}	42,5 ± 4,20 ^{Ba}
Equitainer	39,3 ± 4,17 ^{Aa}	38,2 ± 2,72 ^{Aa}	43,3 ± 4,02 ^{Ba}

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada sistema de refrigeração.
Letras minúsculas: comparam médias de sistemas de refrigeração para cada crioprotetor.

Tabela 16: Médias e desvios padrão da LIN em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração

CRIOPROTETORES			
Congelação - momento	DA	DF	MF
Pré	37,3±3,05 ^A	36,6±2,33 ^A	40,9±3,20 ^B
Pós	40,5±3,62 ^A	40,2±2,70 ^A	45,0±3,90 ^B

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada momento da metodologia de congelação.

A análise do parâmetro percentual de espermatozóides rápidos (RAP) avaliado no momento pré-congelação, não demonstrou diferença entre Equitainer[®] e Max-Semen Express[®] ($p>0,05$). Entretanto, o Equitainer apresentou maior percentual de espermatozóides rápidos em relação a Max-Semen Express[®] no momento pós-congelação ($p<0,05$), conforme descrito na tabela 17.

Tabela 17: Médias e desvios padrão de RAP em %, segundo sistema de refrigeração, independente do crioprotetor

SISTEMA		
Congelação - momento	Max-Semen Express [®]	Equitainer
Pré	70,3±10,27 ^A	71,6±8,45 ^A
Pós	42,6±11,43 ^A	49,8±12,27 ^B

Letras maiúsculas: comparam médias de sistemas em cada momento da congelação.

Com relação ao percentual de espermatozóides rápidos (RAP) o crioprotetor metilformamida foi superior aos demais crioprotetores testados no Max-Semen Express[®] ($p < 0,05$), porém não diferiu da dimetilformamida quando foi utilizado o sistema Equitainer[®] ($p > 0,05$). O mesmo crioprotetor dimetilformamida foi superior a dimetilacetamida ($p < 0,05$), entretanto não diferiram no sistema de refrigeração Max-Semen Express[®] ($p > 0,05$).

A comparação individual dos crioprotetores dentro de cada sistema de refrigeração na avaliação do percentual de espermatozóides rápidos (RAP) constatou a superioridade da metilformamida bem como da dimetilformamida de amostras refrigeradas no Equitainer[®] em relação ao Max-Semen Express[®] ($p < 0,05$). Os valores de percentual de espermatozóides rápidos (RAP) em relação aos sistemas estão descritos na tabela 18.

O percentual de espermatozóides rápidos (RAP) com a utilização do crioprotetor metilformamida foi superior aos demais no momento pré-congelação ($p < 0,05$), contudo no momento pós-congelação diferiu de forma significativa apenas sobre a dimetilacetamida ($p < 0,05$). Os crioprotetores dimetilacetamida e dimetilformamida não diferiram no momento pré-congelação ($p > 0,05$), de acordo com a tabela 19.

Tabela 18: Médias e desvios padrão de RAP em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente do momento da metodologia de congelação

CRIOPROTETORES			
Sistema	DA	DF	MF
Max-Semen Express®	53,5±19,01 ^{Aa}	55,3±16,40 ^{Aa}	60,5±17,54 ^{Ba}
Equitainer	54,1±16,36 ^{Aa}	62,5±19,98 ^{Bb}	65,5±14,14 ^{Bb}

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada sistema de refrigeração.
Letras minúsculas: comparam médias de sistemas de refrigeração para cada crioprotetor.

Tabela 19: Médias e desvios padrão de RAP em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração

CRIOPROTETORES			
Congelação - momento	DA	DF	MF
Pré	67,1±10,12 ^A	69,5±8,69 ^A	76,3±6,68 ^B
Pós	40,6±12,58 ^A	48,4±12,55 ^B	49,6±10,16 ^B

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada momento da metodologia de congelação.
Letras minúsculas: comparam médias de cada momento da metodologia de congelação cada crioprotetor.

A integridade de membrana plasmática (FL) do sêmen congelado, não foi influenciada pelos sistemas de refrigeração, nem tão pouco pelos crioprotetores ($p>0,05$). Todavia, a utilização da metilformamida e dimetilformamida apresentaram resultados superiores de membrana plasmática íntegra em relação à dimetilacetamida no momento pré-congelação ($p<0,05$). Entretanto, os crioprotetores

não diferiram após a congelação ($p>0,05$). Os valores de integridade de membrana estão dispostos nas tabelas 20, 21 e 22.

Tabela 20: Médias e desvios padrão da integridade de membrana plasmática (FL) em %, segundo sistema de refrigeração independente do crioprotetor

SISTEMA		
Congelação - momento	Caixa	Equitainer
Pré	73,3±10,26 ^A	71,6±8,44 ^A
Pós	48,3±8,38 ^A	50,4±7,20 ^A

Letras maiúsculas: comparam médias de sistemas de refrigeração em cada momento da metodologia de congelação.

Tabela 21: Médias e desvios padrão da integridade de membrana plasmática (FL) em %, segundo sistemas de refrigeração e crioprotetores independente da metodologia de congelação

CRIOPROTETORES			
Sistema	DA	DF	MF
Max-Semen Express [®]	60,2± 14,17 ^{Aa}	60,3±13,43 ^{Aa}	61,9±15,38 ^{Aa}
Equitainer	61,6± 14,66 ^{Aa}	62,9±13,25 ^{Aa}	64,4±14,52 ^{Aa}

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada sistema de refrigeração.
Letras minúsculas: comparam médias de sistemas de refrigeração para cada crioprotetor.

Tabela 22: Médias e desvios padrão da integridade de membrana plasmática (FL) em %, segundo o momento da metodologia de congelação e crioprotetores independente do sistema de refrigeração

CRIOPROTETORES			
Congelação	DA	DF	MF
Pré	72,8±4,60 ^A	73,5±3,33 ^B	76,9±2,99 ^B
Pós	48,9±9,74 ^A	49,7±7,20 ^A	49,4±6,52 ^A

Letras maiúsculas: comparam médias de crioprotetores em cada momento da metodologia da congelação.

5.3) Parâmetros espermáticos dos garanhões utilizados no teste de fertilidade

A análise das metodologias de congelação de sêmen empregadas no teste de fertilidade (convencional e congelação após 24 horas de refrigeração) demonstrou que não houve diferença entre parâmetros espermáticos: motilidade total computadorizada e integridade de membrana plasmática pelo uso de sondas fluorescentes ($p>0,05$). Entretanto, a congelação convencional foi superior quando comparada a congelação pós-refrigeração com relação a motilidade progressiva ($p<0,05$). Os valores para motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana estão demonstrados nas tabelas 23,24 e 25, respectivamente.

Quando comparados os resultados de motilidade total entre o garanhão A (Puro Sangue Árabe) e o garanhão B (Westfallen) não foi observada diferença significativa ($p>0,05$). No entanto, na avaliação da motilidade progressiva o garanhão B foi superior ao garanhão A ($p<0,05$). Em relação a integridade da membrana plasmática, o garanhão A apresentou valores superiores ao B em ambos os sistemas de refrigeração ($p<0,05$).

Tabela 23: Médias de Motilidade Total, em %, comparando-se o equino doador e o método de congelação

GARANHÃO		
Congelamento	A	B
Convencional	73,3 ^{Aa}	71,0 ^{Aa}
Pós 24h refrigeração	68,7 ^{Aa}	73,7 ^{Aa}

Letras maiúsculas: comparam médias de cavalos em cada sistema de refrigeração.
Letras minúsculas: comparam médias de sistema de refrigeração para cada cavalo

Tabela 24: Médias de Motilidade Progressiva, em %, comparando-se o equino doador e o método de congelação

GARANHÃO		
Congelamento	A	B
Convencional	34,7 ^{Aa}	40,7 ^{Ba}
Pós 24h refrigeração	22,7 ^{Ab}	37,0 ^{Bb}

Letras maiúsculas: comparam médias de cavalos em cada sistema
Letras minúsculas: comparam médias de sistema para cada cavalo

Tabela 25: Médias de integridade de membrana plasmática, em %, comparando-se o equino doador e o método de congelação

GARANHÃO		
Congelamento	A	B
Convencional	53,8 ^{Aa}	46,7 ^{Ba}
Pós 24h refrigeração	54,2 ^{Aa}	46,5 ^{Ba}

Letras maiúsculas: comparam médias de cavalos em cada sistema de refrigeração.
Letras minúsculas: comparam médias de sistema de refrigeração para cada cavalo.

5.4) Teste de fertilidade

O garanhão Puro Sangue Árabe (A) apresentou 40% de fertilidade com o sêmen submetido ao procedimento convencional de e 50% para o sêmen refrigerado por 24h em Equitainer® e posteriormente congelado ($p>0,05$). Já o garanhão Westfallen (B) apresentou 80% de fertilidade em ambos os grupos ($p>0,05$). Apesar das diferenças numéricas entre os garanhões dentro metodologias de congelamento, não foi observado diferenças significativas ($p>0,05$). Os valores de fertilidade para os garanhões A e B estão demonstrados na tabela 26.

Tabela 26: Número de éguas prenhes e vazias de acordo com o garanhão e sistema de congelamento

GARANHÕES				
Congelamento	Garanhão A		Garanhão B	
	Prenhes	Não prenhes	Prenhes	Não prenhes
Convencional	4 (40%)	6 (60%)	8 (80%)	2 (20%)
Pós-refrigeração	5 (50%)	5 (50%)	8 (80%)	2 (20%)

Entre sistemas $\chi^2=0,6$ $p>0,05$

Entre garanhões $\chi^2=2,75$ $p>0,05$

Discussão

6) DISCUSSÃO

A evolução da biotecnologia de congelação de sêmen na espécie eqüina tem sido intensa, mas os resultados obtidos ainda estão bem distantes daqueles almejados. Vários fatores limitantes à técnica de congelação de sêmen de garanhões podem ser relacionados: custo dos equipamentos, preparação de diluentes para congelação, bem como deslocamento de todo esse material até as propriedades rurais, que nem sempre preenchem os requisitos básicos necessários para proceder a criopreservação.

Para minimizar essas dificuldades têm sido desenvolvidas técnicas no Brasil e no exterior, com o objetivo de adequar uma metodologia que possibilite a colheita do sêmen nos estabelecimentos rurais, diluição, pré-resfriamento em sistemas de transporte adequados e o seu envio para laboratórios especializados para congelação (Crockett et al., 2000; Backman et al., 2004).

A utilização do sêmen criopreservado viabiliza o uso de um reprodutor em momentos nos quais não seria possível a monta natural ou ainda utilizar o sêmen a fresco ou resfriado, devido à participação do animal em atividades esportivas, assim como nos casos em que o animal está inapto à reprodução ou quando o mesmo veio a óbito. Sendo assim, esta biotécnica otimiza a utilização de garanhões geneticamente superiores de diversos locais do mundo sem os gastos inerentes ao transporte tanto do macho como da fêmea, além de aumentar o número de animais a serem acasalados com um determinado reprodutor (Graham, 1996).

O *Experimento I* do presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade da congelação de sêmen refrigerado por um período de 24 horas. Para o armazenamento das amostras refrigeradas foi escolhido o sistema Equitainer[®], por

se tratar de um sistema seguro e eficiente na manutenção da viabilidade espermática após o período desejado de refrigeração (Carvalho, 2003; Macedo, 2005), refrigeração de sêmen equino a temperatura em torno de 5°C, que é considerada ideal quando comparada a de 20°C (Varner et al., 1989; Kayser et al., 1992), e temperatura entre 4-6°C, adequada à manutenção da motilidade e da fertilidade (Palmer et al., 1984; Squires et al., 1988).

No *Experimento I* foi utilizado o diluente Botu-Crio® em associação com 3% de glicerol e 2% de dimetilformamida (DF) para a congelação das amostras de sêmen nos dois protocolos estudados. Tal escolha foi baseada em estudos que utilizaram esta associação e verificaram a efetividade da mesma na manutenção dos parâmetros espermáticos, bem como da fertilidade (Zahn, 2002; Neves Neto, 2004).

A escolha da temperatura de adição do diluente Botu-Crio® (20°C) foi fundamentada no fato do sêmen encontrar-se refrigerado na temperatura em torno de 8°C. O aquecimento destas amostras através do uso de um diluente de congelação a temperatura de 37°C (Papa et al., 2002) submeteria estes espermatozóides ao estresse térmico inerente ao aquecimento brusco das amostras (Squires et. al., 1999) com diluentes em altas osmolaridades. Desse modo, os espermatozóides passariam duas vezes pela fase de transição da membrana plasmática da fase líquida cristalino para o estado de gel, durante as mudanças de temperatura (Graham, 1996).

Conforme observado no *Experimento I*, o qual comparou dois protocolos de congelação de sêmen (convencional vs pós-refrigeração), a metodologia testada, ou seja, congelação de sêmen após o período de 24h refrigeração não interferiu nos parâmetros espermáticos avaliados: *motilidade total e progressiva*, bem como a *integridade de membrana* avaliada através de sondas fluorescentes. Os resultados

das duas metodologias de congelação testadas foram semelhantes quando a refrigeração foi realizada no sistema Equitainer[®]. Os resultados encontrados no presente estudo diferem de Crockett et al. (2000), os quais obtiveram baixa motilidade com o sêmen refrigerado por 24h à 5°C antes da congelação.

No *Experimento II* foram comparados dois sistemas de refrigeração e a ação de três crioprotetores na manutenção da viabilidade espermática de sêmen congelado. O sistema Equitainer[®] demonstrou ser mais adequado ao processo de refrigeração por 24 horas em relação ao Max-Semen Express[®], uma vez que apresentou valores superiores para *motilidade total, progressiva e percentual de espermatozóides rápidos*. Os resultados superiores obtidos com o Equitainer[®] se devem a manutenção de uma temperatura mais adequada, durante o período de refrigeração com média de 8,7°C contra 16,8°C do Max-Semen Express[®]. Os sistemas foram mantidos a temperatura ambiente em torno de 24°C por 24 horas. Os resultados encontrados no presente experimento corroboram com os achados de Varner et al. (1989), Kayser et al. (1982), Palmer et al. (1984), Squires et al. (1998), Magistrini et al. (1982) *apud* Batellier et al. (2001) que consideram a temperatura de 5°C como ideal na manutenção da viabilidade espermática em amostras de sêmen refrigeradas quando comparada à temperatura de 20°C, bem como os obtidos por Carvalho (2003) que comparou a refrigeração de sêmen no Equitainer com amostras mantidas em geladeira e temperatura entre 5°C e 8°C.

Diversos estudos têm buscado a melhor opção de crioprotetores para a espécie eqüina (Alvarenga et al., 2000a; Alvarenga et al., 2000b; Arruda, 2000; Gomes et al., 2002; Papa et al., 2002; Medeiros et al., 2002b; Rossi et al., 2003; Squires et al., 2004; Papa et al., 2004), especialmente pelo fato do glicerol ser tóxico quando utilizado isoladamente em altas concentrações.

O presente estudo comparou a utilização do glicerol associado às amidas: dimetilacetamida (DA), dimetilformamida (DF) ou metilformamida (MF). Apesar de alguns autores relatarem a toxicidade do glicerol (Fahy, 1986; Amann & Pickett, 1987; Fahy, 1990; Hammerstedt & Graham 1992;) a associação 3% de glicerol com 2% dimetilformamida no diluente MP 50 (Botu-Crio[®]) utilizado *no Experimento I*, não interferiu nos parâmetros espermáticos avaliados e se assemelharam aos obtidos por Zahn (2002). No *Experimento II* foi utilizada uma proporção de 1% de glicerol e 4% das amidas, e também não se verificou qualquer influência deletéria desse crioprotetor sobre os parâmetros espermáticos avaliados. A utilização do glicerol nesta pequena porcentagem deveu-se aos resultados alcançados por diversos pesquisadores que utilizaram associação dos crioprotetores os quais demonstraram resultados superiores dos parâmetros espermáticos quando comparados com o uso das amidas ou glicerol isoladamente (Medeiros et al., 2002b; Rossi et al., 2003; Neves Neto, 2004). Esta ação deletéria do glicerol sozinho pôde ser constatada em trabalhos com ganhões comprovadamente de baixa congelabilidade, mostrando que o crioprotetor foi prejudicial sobre os parâmetros espermáticos quando comparados com amostras congeladas com as amidas isoladas ou suas associações, inclusive com o glicerol (Gomes et al., 2002).

Os sistemas de refrigeração Max-Semen Express[®] e Equitainer[®] não influenciaram na ação dos crioprotetores sobre os parâmetros espermáticos avaliados, visto que os resultados obtidos com a utilização dos crioprotetores não diferiram significativamente em relação aos sistemas. Quando comparada a *motilidade total* com o uso dos crioprotetores nos dois sistemas de refrigeração, tanto a metilformamida (MF) como a dimetilformamida (DF) foram superiores a dimetilacetamida (DA), independente do sistema utilizado. A comparação e

discussão dos resultados encontrados não foram possíveis, uma vez que a literatura inerente a estes estudos não abordam num mesmo experimento: congelação após refrigeração em diferentes sistemas, combinados com o uso de diferentes crioprotetores e suas associações. Crockett et al. (2000) e Backman et al. (2004) desenvolveram trabalhos com os mesmos objetivos da presente pesquisa, mas que se assemelham apenas no fato da refrigeração ter sido realizada em sistema Equitainer, porém com períodos de refrigeração de 2, 6, 12 e 24 horas (Crockett, et al, 2000) e de 18 horas (Backman et al., 2004).

A superioridade da MF em relação aos outros crioprotetores para os parâmetros espermáticos avaliados também pôde ser observada logo após o período de 24 horas de refrigeração nos dois sistemas, o que corresponde ao momento pré-congelação. A *motilidade total* da MF foi superior a DA e semelhante a DF no momento pré-congelação. Após a congelação, os crioprotetores DF e MF foram semelhantes com relação a *motilidade total* e ambos foram superiores a DA. Medeiros et al. (2002b) também observaram a superioridade da DF (5%) e MF (5%) para o parâmetro *motilidade total*, entretanto, os mesmos autores não observaram diferença destes crioprotetores em relação a DA quando esta foi utilizada nas concentrações entre 3 e 5% para o congelamento convencional. Rossi et al. (2003) observaram uma superioridade das associações entre MF e glicerol e entre DF e glicerol em relação às associações DA e glicerol, DA, DF e MF isoladamente.

Para o parâmetro *motilidade progressiva* nos momentos pré e pós-congelação a MF foi superior a DA e a DF, independente do sistema de transporte utilizado. Medeiros et al. (2002b) e Squires et al. (2004) utilizando metodologias convencionais de congelação, também observaram valores numéricos superiores da MF em relação aos mesmos crioprotetores utilizados no presente estudo. Porém os

últimos autores observaram que esta diferença em favor da MF não foi estatisticamente significativa.

Os resultados da análise da *integridade da membrana plasmática* demonstraram, não haver diferenças significativas entre os crioprotetores testados independente do sistema de refrigeração utilizado. Apesar da DF e da MF serem superiores a DA no momento pré-congelação, o mesmo não foi observado após a descongelação, visto que os três crioprotetores estudados não diferiram significativamente. Medeiros et al. (2002b) avaliaram a integridade de membrana plasmática utilizando os mesmos crioprotetores do presente trabalho, na concentração de 5% e também não encontraram diferença significativa. Squires et al. (2004) pesquisando vários crioprotetores na congelação de sêmen eqüino, também não observaram diferença entre a DF e a MF com relação a viabilidade espermática.

Apesar da semelhança entre os crioprotetores MF e DF em relação à boa parte dos parâmetros espermáticos avaliados, a metilformamida foi superior aos demais na manutenção da *motilidade progressiva* e do *índice de progressivo* (STR) no momento pós-congelação como em relação aos sistemas de refrigeração estudados. Os autores Squires et al. (2004) e Medeiros et al. (2002b) ao analisarem a *motilidade progressiva* constataram que a MF apresentou valores superiores em relação aos outros crioprotetores ($p < 0,05$), Gomes et al. (2002) também verificaram a eficiência da MF e a DF na manutenção da *motilidade progressiva* em garanhões da raça Mangalarga Marchador, os quais são considerados de baixa congelabilidade.

O teste de *fertilidade* foi realizado comparando-se dois grupos: a metodologia convencional de congelação de sêmen eqüino segundo (Papa et al.,

2002) e a congelação após 24 horas de refrigeração em Equitainer[®], com dois garanhões que foram submetidos aos testes laboratoriais.

A análise das amostras de sêmen dos garanhões utilizados no *teste de fertilidade* não demonstrou diferença significativa para a *motilidade total* e *integridade da membrana plasmática* quando do uso das metodologias de congelação de sêmen: convencional e após 24 horas de refrigeração. Já Backman et al. (2004) constataram a superioridade da metodologia convencional para todos os parâmetros e momentos analisados. Contudo os resultados de *motilidade progressiva* observados com a metodologia convencional foram superiores aos obtidos pela congelação de sêmen pós-refrigerado por 24 horas, que se assemelharam aos encontrados por Backman et al. (2004) com refrigeração de 18 horas.

Com relação aos garanhões utilizados no *teste de fertilidade*, estes não diferiram quando o parâmetro espermático avaliado foi a *motilidade total*, porém o garanhão A foi inferior para a *motilidade progressiva*, mas os valores de *integridade de membrana plasmática* foram superiores quando comparado com o garanhão B.

Os valores encontrados de *motilidade total* e *progressiva* em amostras de sêmen dos garanhões A e B para as duas metodologias de congelação foram superiores as descritas por Backmann et al. (2004), tanto para o protocolo convencional, quanto para a congelação de sêmen refrigerado. Crockett et al. (2000) ao congelarem amostras após períodos de 2, 6 e 12 horas pós refrigeração, obtiveram valores inferiores para a *motilidade total* quando comparados aos garanhões A e B, porém, para a *motilidade progressiva* os valores descritos por estes autores foram semelhantes aos do presente estudo.

Os *índices de fertilidade* com ambos os garanhões, não diferiram significativamente em nenhum dos protocolos de congelação testados, bem como entre os garanhões. Provavelmente as diferenças numéricas entre os garanhões utilizados não tenham sido estatisticamente significativas, devido ao número de éguas inseminadas ($n=10$) para cada grupo. De acordo com Graham & Mocé (2005), para se correlacionar os achados laboratoriais com a fertilidade, o número ideal de éguas a serem inseminadas em um experimento equivaleria a 100 animais, entretanto, devido aos gastos elevados com manutenção dos animais, grande parte dos trabalhos publicados com sêmen congelado não realizam testes de fertilidade.

Os *índices de fertilidade* encontrados na literatura são variáveis conforme pode ser constatado nas tabelas apresentadas na Revisão de Literatura do presente trabalho, provavelmente devido às diferenças nos protocolos de congelação de sêmen (Samper & Morris, 1998), diluentes de congelação (Neves Neto, 2004), crioprotetores (Medeiros et al., 2002b), metodologias de inseminação artificial (Dell' Aqua Jr, 2000; Gomes, 2002; Leão, 2002) e doses inseminantes (Squires et al., 1998; Dell' Aqua Jr, 2000; Leão, 2002). A dificuldade na obtenção resultados constantes de fertilidade talvez seja um dos fatores limitantes da disseminação e propagação desta biotécnica com uma velocidade maior.

Os resultados de fertilidade encontrados para o garanhão A quando foi empregada a metodologia de congelação convencional, foram semelhantes aos obtidos por Neves Neto (2004) que utilizou os diluentes FR4 (INRA 82) e o BME (Basal Medium Eagle). Os protocolos de inseminação artificial utilizados por este autor foram semelhantes aos empregados no presente estudo, usando a concentração espermática de 400×10^6 nos momentos pré e pós ovulação, sendo o sêmen depositado no ápice do corno uterino ipsilateral a ovulação.

A utilização da metodologia de congelação após 24 horas de refrigeração resultou *índices de fertilidade* semelhantes aos obtidos por muitos autores, conforme pode ser constatado nas tabelas A e B. Entretanto, a comparação dos *índices de fertilidade* com uso de sêmen congelado após 24 horas de refrigeração para o garanhão A (50%) foram inferiores aos obtidos por Backman et al. (2004) (70%), porém estes autores utiliza apenas 18 horas de refrigeração.

Já o garanhão B apresentou excelentes índices de fertilidade, ou seja, 80% para a metodologia convencional e congelação após 24 horas de refrigeração. Os resultados de fertilidade foram superiores a média descrita na literatura referente ao uso de sêmen congelado (tabelas A e B), conforme descrito anteriormente, porém semelhantes aos descritos por Zahn (2002) utilizando o diluente MP 50 com 3% de glicerol e 2% de DF no protocolo convencional de congelação e os obtidos por Backman et al. (2004), que refrigeraram o sêmen por 18 horas, confirmando o aspecto da variação individual de fertilidade de sêmen congelado entre garanhões.

Conclusões

7) CONCLUSÕES

A partir dos resultados e nas condições em que os experimentos foram realizados foi possível concluir que:

- A metodologia de congelação de sêmen eqüino após a refrigeração em Equitainer[®] foi tão eficiente quanto ao método descrito por Papa et. al (2002) na manutenção dos parâmetros espermáticos avaliados.
- O sistema Equitainer demonstrou-se mais adequado na manutenção da viabilidade espermática após 24 horas de refrigeração em relação ao Max-Semen Express, quando mantidos a temperatura ambiente em torno de 24°C.
- Os sistemas de refrigeração testados Equitainer[®] e Max-Semen Express[®] não influenciaram a ação dos crioprotetores no processo de congelação de sêmen.
- A associação do glicerol (1%) e a metilformamida (4%) ao diluente Botu-Crio[®] foi eficaz na manutenção da viabilidade espermática nas duas metodologias de congelação, assim como nos índices de fertilidade.
- O uso de sêmen congelado após 24 horas de refrigeração em Equitainer apresentou índices de fertilidade semelhantes aos obtidos com o protocolo convencional de congelação.

Comentários Finais

8) COMENTÁRIOS FINAIS

Com base nos resultados laboratoriais e de fertilidade obtidos no presente estudo, pode-se afirmar que a refrigeração em Equitainer por 24 horas previamente a congelação mostrou-se plenamente viável a criopreservação de sêmen na espécie eqüina.

A metodologia de congelação de sêmen testada mostrou ser mais uma ferramenta para se atingir não só a padronização desta biotécnica, como também um aumento no número de garanhões que podem ser aprovados no teste de congelabilidade. Outra vantagem da técnica testada é a redução dos gastos e estresse com o transporte de garanhões até uma central de processamento de sêmen, evitando o deslocamento do médico veterinário até o haras.

A combinação de diluentes, crioprotetores, metodologia de congelação, indução da ovulação e inseminação artificial, aliados aos resultados de fertilidade demonstram que as pesquisas com sêmen congelado, caminham para a obtenção de uma metodologia próxima do ideal, pois o nivelamento das congelações deu um grande salto de qualidade, e conseqüentemente um aumento na amplitude de congelabilidade entre as diversas raças e idade dos garanhões, principalmente os de baixa congelação que tem apresentado melhorias nas características espermáticas e porcentagens de fertilidade.

Para a manutenção e melhoria dos índices obtidos no presente trabalho, faz-se necessário a continuidade das pesquisas biotecnológicas com sêmen congelado de garanhões.

Referências

9) REFERÊNCIAS

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. **Theriogenology**, v.57, p.1801-1808, 2002.

ALMLID, T., JOHNSON, L.A. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. **Journal of Animal Science**, v.66, p.2899-905, 1988.

ALTHOUSE, GC; WILSON, ME; 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.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, v. 32(6), p.541-545, 2000a.

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

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

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-73, 1987.

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

ANCHORDOGUY, T.J.; RUDOLPH, A.S.; CARPENTER, J.F.; CROWE, J.H. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipides during freezing. **Cryobiology**, v.24, p.324-331, 1987.

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

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

BAUDOT, A.; CAULA, C.; DUARTE, M.L.; FAUSTO, R Thermal study of simple amino-alcohol solution, **Cryobiology**, v.44, p.150-160, 2002.

BAULNY, B.O.; LABBE, C.; MAISSE, G. Membrane integrity mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. **Cryobiology**, v.39, p.177-184, 1999.

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

BATELLIER, F., MAGISTRINI, M., FAUQUANT, J., PALMER, E. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology** 48, 391–410, 1997.

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.

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

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.

CARVALHO, G. A. **Estudo de diferentes diluentes sobre a viabilidade espermática, utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen eqüino**. Botucatu 2003. 138p. Tese (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

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

COCHRAN, W.G.; COX, G.M. **Experimental designs**. John Wiley, New York. 617p., 1957

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

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; AURELLWISTROM, C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, v.242, p.1-10, 1987.

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

De LEEUW, F.E.; De LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.G.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing

compound on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. **Cryobiology**, v.30, p.32-44, 1993.

DELL'AQUA Jr., J. A. **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado eqüino**. Botucatu, 2000. 81p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

DELL'AQUA JR., J.A., PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A., ZAHN, F.S. Effect of packing systems and thawing temperature on spermatoc parameters and fertility rate of frozen equine semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25 n.1, p.458-460, 2001.

FAHY, G.M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. **Cryobiology** v.23, p. 1-13, 1986.

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

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

FERREIRA, J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelação do sêmen eqüino**. Botucatu, 2000. 93 p. Tese (Doutoramento) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

FISER, P.S., FAIRFULL, R.W. The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. **Cryobiology**, v.26, p.64-9, 1989.

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

GRAHAM, J.K. & MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

GOMES, G.M. **Efeito da seleção espermática por gradiente de Percoll e inseminação artificial por endoscopia, sobre a fertilidade e reação inflamatória ao sêmen congelado de garanhões**. Seropédica, 2002. 71p. Tese (Mestrado) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F., MEDEIROS, A.S.L; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion preservation spermatozoa with alternative cryoprotectant for Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.

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

HARRISON, R.A., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-52, 1990.

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

IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J.P. Long-term preservation of chilled canine semen effect of commercial and laboratory prepared extenders. **Theriogenology**, v.55, p.671-684, 2001.

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.

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, D.J.; BEDFORD, S.J.; COOK, N.L.; MUMFORD, E.L., SQUIRES, E.L. PICKETT, B.W. Effect of antibiotics on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.40, p.885-893, 1993.

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

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

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

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.

KIRK, E.S. **Flow cytometric evaluation of stallion sperm**. Fort Collins, 2001. 131p. Tese (Master of Science) – Colorado State University.

KOTYAGINA, V.; PLATOV, E.; ROMBE, S. The fertility of stallion semen preserved at a temperature of -78°C. **Animal Breeding Abstracts**, v.31, p.458, 1963

KUNDU, C.N.; DAS, K.; MAJUMDER, G.C. Effect of amino acid on goat cauda epididymal sperm cryopreservation using chemically defined model system. **Cryobiology**, v.41, p.21-27, 2001.

LEÃO, K.M. **Inseminação artificial por endoscopia com número reduzido de espermatozóides utilizando sêmen fresco e congelado de garanhões**. Botucatu 2002. Tese (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

LOOMIS, P.R., AMMAN, R.P., SQUIRES, E.L. e PICKETT, B.W. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg-yolk and packaged in straws. **Journal of Animal Science**, v.56, p. 687-693, 1983.

McCALL, J.P. e SORENSEN, A.M. Evaporated milk as an extender for stallion semen. **AI Digest**, v.12, p.8-10, 1971.

MACEDO, L.P. **Efeito de diferentes diluentes e antibióticos sobre a longevidade e fertilidade do sêmen eqüino refrigerado a 5°C**. Botucatu 2005. 80P. Tese (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

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 eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, p.194-196, 2002.

Magistrini, M., Couty, I., Palmer, E., Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival. **Acta Vet. Scand.** 88 (Suppl.), p.97–110.1992.

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

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

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

MEDEIROS, A.S.L. **Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozóides de garanhões**. Botucatu, 2003. 96p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

MORAN, D.M. **Effects of cooling rate and storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa**. Fort Collins, 1992. Dissertação (Mestrado) – Colorado State University.

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

NAGASE, H. Studies on the freezing of stallion semen. I.Fertility results with stallion semen frozen in concentrated pellets form. II.Factors affecting survival rates of stallion spermatozoa after freezing and thawing and results of a fertility trial. **Animal Breeding Abstracts**, v.35, p.195, 1967.

NEVES NETO, J.R. **Avaliação da congelabilidade e fertilidade do sêmen eqüino frente a diferentes diluidores**. Botucatu, 1998. 90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

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

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 10th, 1984, Urbana-Champaign - E.U.A., **Proceedings...** 1984. p.377-79.

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

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

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

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA Jr, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.184-187, 2002.

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

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

PROVINCE, C.A.; SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.23, p.925-934, 1985.

ROMBE, S.; KOTJAGINA, V.; PILER, N. An Improvement method of preserving semen at -79°C . **Animal Breeding Abstract**, v.33, p.363, 1965.

ROSSI, T.C., PAPAFO., SANTOS, T.B., MACEDO, L.P., ALVARENGA, M.A., MELO, C.M., DELL'AQUA Jr., J.A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelação de sêmen eqüino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.350-352, 2003

SAMPER, J.C., MORRIS, C.A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**, 1998.

SEIDEL, G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: THECNQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS, 1986, Fort Collins. **Proceedings...**Fort Collins: Colorado State University, 1986. p . 6-12.

SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.; McKINNON, A.O.; PICKETT, B.W. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5°C or 20°C . In: INTERNATIONAL CONGRESS IN ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 11., 1988, Dublin. **Proceedings...** Dublin, 1988. p.297-299.

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, Colorado State University, Bulletin nº9, 1999

STOREY, B.T.; NOILES, E.E.; THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose and raffinose to provide defined cryoprotectant medium for mouse spermatozoa cryopreservation. **Cryobiology**, v.37, p.46-58, 1998.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LANNOU D.Le.; BARRIÈRE, P.; TAINURIER, D. Improvement of motility of post-thaw poitou jackass sperm using using glutamine. **Theriogenology**, v.45, p.1015-1027, 1996.

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

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

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v. 7, p. 871-91, 1995.

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

WILHELM, K.M.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. **Cryobiology**, v.33, p.320-329, 1996.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Celular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v.24, p.438-450, 2001.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v.54, p.579-585, 2000.

ZAHN, F.S. **Efeito da incorporação de colesterol na membrana plasmática de espermatozóides sobre os parâmetros espermáticos e índice de fertilidade do sêmen congelado na espécie eqüina**. Botucatu, 2002.110p. Dissertação

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

ZAR, J.H. **Bioestatistical Analysis**. Prentice Hall. New Jersey. 718p.1996.

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

Anexos

ANEXOS

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

ANEXO II

PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

Solução de estoque das sondas fluorescentes

Soluções	Constituintes	Quantidade
Estoque IP	Iodeto de Propídeo ¹	10mg
	Solução fisiológica	20mL
Estoque CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína ²	9,2mg
	DMSO	20mL
Estoque de Formaldeído	Formalina a 40%	1mL
	Solução fisiológica	79mL
Estoque de citrato de Sódio	Citrato de sódio	3g
	Solução fisiológica	100mL

¹ P 4170 - Sigma

² C 5041 – Sigma

Solução de trabalho

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