

FRANCISCO JOSÉ GONÇALVES DE OLIVEIRA

EFEITO DA ADIÇÃO DE GLICEROL EM DIFERENTES ETAPAS DO
RESFRIAMENTO SOBRE A CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE GARANHÕES

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiro lugar em todas as coisas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade e pelo apoio, fundamental para a realização desse projeto de pesquisa.

A meus pais.

A minhas avós, inesgotável fonte energia e sabedoria para eu seguir em frente.

A meus tios Rita Flávia e Juarez, estímulos constantes na inconstante tempestade de nervos que é Viçosa.

Aos parentes de uma forma geral. Em especial a Dona Inês pelas diversas orientações e ao Seu Bernardo pela confiança no meu profissional.

Ao professor JD, pela confiança em todos os aspectos depositada em mim, pela oportunidade que me foi dada de errar com consciência e foco na intenção de se acertar, pelo exemplo de humildade que todo ser humano deve ter.

Aos amigos Lucas, Eduardo e Bruno, simplesmente pelo espírito de fraternidade sincera e incondicional de anos de convívio.

Ao professor Giovanni, pela confiança e lições nesses anos.

Aos professores do DVT pela atenção prestada a mim, em especial ao professor Marco Aurélio, pela confiança durante esses anos.

Aos amigos não viçosenses: Flávio, Gabi, Keila, pessoas do grupo OPA e todos os outros ...

Aos amigos quase viçosenses: Rogério, Léo, Renan Homer, Morgana, Renan Boca, Erick e Maurício Japa pelo apoio. Ao Igor, pela ajuda na realização desse trabalho.

1. INTRODUÇÃO

A equídeocultura é uma atividade com grande importância sócio-econômica em muitos países. Essa característica é refletida, por consequência, nos aspectos culturais dessas nações. Estudo recente, realizado pela American Horse Council, revela que, nos Estados Unidos, a indústria do cavalo contribuiu com aproximadamente 39 bilhões de dólares no impacto econômico, sendo que, somente as corridas de equinos da raça Puro Sangue Inglês, contribuiu com 20 bilhões de dólares ao PIB americano (Lamarra, 2005).

A atividade no Brasil também apresenta grande relevância nesse sentido, uma vez que o país possui o terceiro maior plantel mundial de equinos, com aproximadamente 5,9 milhões de animais. (Dé Carli Filho, 2004). Adicionalmente, a atividade emprega aproximadamente 500 mil pessoas, sendo de importância considerável na economia do país.

O crescente interesse pelas biotécnicas aplicadas à reprodução de equinos poderá acelerar o ganho genético nessa espécie animal, tornando-os mais competitivos e facilitando a inserção de raças genuinamente brasileiras no mercado internacional cada vez mais exigente.

A inseminação artificial talvez seja a biotecnologia da reprodução animal mais viável em termos econômicos. No entanto, na espécie eqüina, essa não evoluiu e nem acompanhou o desenvolvimento observado nas espécies bovina e ovina, principalmente no que se refere à inseminação com sêmen congelado. Para Pimentel et al. (1998) a inseminação artificial em equinos com sêmen congelado apresenta entraves como a variação de congelabilidade de garanhões que apresentam boa fertilidade com a utilização de sêmen fresco ou resfriado. Adicionalmente, sabe-se que é uma espécie que apresenta grande suscetibilidade, em termos de membrana plasmática espermática, ao resfriamento de sêmen.

A criopreservação de sêmen e o seu uso na inseminação artificial revolucionou a bovinocultura há mais de meio século. No entanto, a mesma não pôde ser aplicada à espécie eqüina, devido às diferenças bioquímicas e biofísicas entre essas espécies, que não favorecem sua viabilidade comercial. As taxas de concepção por estro utilizando essa técnica variam bastante, sendo que em alguns garanhões chegam a oscilar entre 25 e 40 %. Adicionalmente, sabe-se que boa parte dos garanhões não respondem bem a essa biotécnica, o que faz com que o número de

pesquisas nesse sentido venha aumentando cada vez mais, com o intuito de superar a variação individual relatada por Pickett & Amann (1993) e Cotorelo & Henry (2002).

A descoberta do glicerol como agente crioprotetor revolucionou os métodos de criopreservação de diversas células e tecidos. Isso contribuiu bastante, principalmente no caso de bancos genéticos de espécies ameaçadas de extinção. No entanto, sabe-se que o glicerol é um crioprotetor que apresenta efeitos deletérios às células espermáticas, devido às suas características de peso molecular e osmolariade. Por isso, muitos estudos vêm buscando testar a atuação de outros crioprotetores no diluidor para congelamento do sêmen equino. Entre esses pode-se exemplificar a utilização de agentes não permeáveis como alguns açúcares (trealose e rafinose) e as amidas permeáveis (dimetilformamida, acetamidas, dimetilacetamidas, etc.), ou mesmo o etilenoglicol.

No entanto, apesar de haver variação individual entre animais de uma mesma espécie quanto à congelabilidade espermática, o glicerol ainda é o crioprotetor mais comumente utilizado. Suas vantagens viabilizam a aplicabilidade, mesmo com as descobertas de novos crioprotetores por suas características estruturais e funcionais não interferirem no metabolismo dos espermatozóides. Por isso, muitos autores buscam racionalizar a ação desse agente, maximizando o efeito crioprotetor e minimizando os efeitos deletérios que o mesmo apresenta à criopreservação.

Esses autores têm considerado que a adição fracionada ou dissociada do glicerol durante o resfriamento do sêmen a ser congelado, pode contribuir para o sucesso dessa biotécnica, uma vez que, mantendo as células com o menor tempo de equilíbrio possível com o glicerol, seu efeito tóxico não seria sentido pelas mesmas. Ao mesmo tempo, a alta solubilidade e o poder de penetração celular após sua adição, garantiriam a proteção dos espermatozóides.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição do crioprotetor glicerol, com 0, 35 e 60 minutos de resfriamento do sêmen equino, sobre sua congelabilidade, observando parâmetros físicos de motilidade espermática total e vigor espermático, morfologia espermática, realizando avaliações de integridade física e funcional de membrana por testes hiposmóticos e supravitais e realizando avaliações de longevidade por teste de termoresistência, antes e após o congelamento.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos relacionados a criopreservação do sêmen de garanhões

Segundo Holt (2000 a), o processo de criopreservação é letal para uma porção significativa da população espermática que entra no processo, o que acarreta a necessidade de aumentar a concentração na dose inseminante. Muitos fatores podem afetar a sobrevivência da célula espermática durante a criopreservação. Dentre esses, a taxa de resfriamento (Watson & Morris, 1987; Fürst et al., 2003) e a forma de envasamento do sêmen (Dell'Aqua Júnior, 2000). A concentração espermática também é outro fator que pode estar relacionado à congelabilidade do sêmen, principalmente quando a mesma excede a quantia de 800×10^6 espermatozóides em uma palheta de sêmen congelada (Heitland et al., 1996).

Guay & Rondeau (1981) relataram, dentre esses fatores, a própria individualidade do animal, devido à pouca resistência ao choque térmico ou à intolerância a certos crioprotetores, como o glicerol ou o etilenoglicol. Nesse sentido, Pickett & Amann (1993) citam que eqüinos, que apresentam boa taxa de fertilidade e concepção com sêmen fresco ou resfriado, podem não apresentar bons índices reprodutivos com sêmen congelado, sendo essa uma variação individual importante entre animais de uma mesma espécie.

Atualmente, existem muitas diferenças entre protocolos de criopreservação de sêmen eqüino, que variam de acordo com a experiência de cada laboratório e com as principais observações quanto à alteração no metabolismo e estrutura da célula espermática no que se refere ao processo de congelamento e descongelamento (Samper & Morris, 1998; Neild et al., 2003).

O resfriamento a 5° C é necessário para a estocagem do sêmen por um determinado período de tempo ou para o início do processo de congelamento. Os danos causados às células espermáticas durante esse processo podem ocorrer diretamente em suas estruturas, ou indiretamente ao alterar sua funcionalidade. O rápido resfriamento das células espermáticas pode estar associado à perda de motilidade espermática, batimentos flagelares anormais, danos à membrana plasmática e à membrana acrossomal, redução do metabolismo, e perda de componentes intracelulares (Pickett & Amann, 1993).

2.1.1. Resfriamento do sêmen e o choque térmico na membrana plasmática espermática

Um dos grandes entraves ao congelamento do sêmen de garanhões é a baixa resistência dos espermatozóides ao resfriamento. Para controlar tais dificuldades, busca-se, dentro de novos protocolos, amenizar a curva de resfriamento previamente ao congelamento, principalmente nas faixas de temperaturas consideradas críticas aos espermatozóides (Watson & Morris, 1987; Vidament et al., 2000).

O choque térmico de membrana é oriundo do resfriamento abrupto. Amann & Pickett (1987) e Amann & Graham (1993) descreveram os eventos nos espermatozóides eqüinos, sendo esse fenômeno caracterizado como uma série de alterações, que acontecem quando o resfriamento espermático atinge a faixa de temperatura entre 18° C e 8° C. Diante do choque térmico, uma série de eventos pode ocorrer na membrana plasmática dos espermatozóides eqüino, o que pode repercutir na inviabilidade da célula para fertilização. Ocorre migração de proteínas de membrana, o que aumenta a aglomeração das mesmas na superfície da célula, resultando na alteração da fluidez dos fosfolipídios da membrana plasmática durante o resfriamento, onde coexistem moléculas em domínios cristalinos e em domínios fluídos. A fase específica de temperatura para cada fosfolipídio na membrana resulta na migração lateral, com um novo arranjo dos componentes da membrana plasmática, e na separação dos lipídios do plano da membrana (Holt, 2000 a; Medeiros et al., 2002). Com esse novo arranjo, as proteínas de membrana são forçadas a permanecerem em domínios fluídos, o que permite a aglomeração dessas moléculas nesses domínios.

O aumento da concentração de proteínas em um determinado espaço da membrana plasmática favorece a instabilidade dos fosfolipídios. Essa instabilidade está associada ao aumento da permeabilidade celular a íons extracelulares, característica que potencializa os efeitos deletérios do choque térmico, principalmente diante de grandes concentrações de ácidos graxos polinsaturados (Holt, 2000 a).

Por outro lado, sabe-se que os colesteróis são moléculas que estabilizam a membrana plasmática durante o resfriamento (Drobnis, et al., 2005; Álvarez et al., 2006). No entanto, na espécie eqüina, o teor de colesterol é bastante inferior em

relação a fosfolipídios (razão = 0,36 na espécie eqüina), o que acarreta maior sensibilidade aos danos causados pelo resfriamento (Amann & Graham, 1993)

A instabilidade dos fosfolipídios está refletida na alteração da conformação de “dupla camada lipídica”, transformando em um novo arranjo denominado Fase Hexagonal II (HEX II), onde a porção polar (hidrofílica) dos fosfolipídios se aglomera, assumindo uma forma cilíndrica, em meio à membrana plasmática dos espermatozóides (Amann & Graham, 1993). Naturalmente, nem todos os fosfolipídios de membrana tendem a formar dupla camada. Estes, geralmente estão associados às proteínas de membrana e possuem a função de eliminar possíveis poros que a dupla camada lipídica venha a formar. Diante de resfriamentos abruptos, tais fosfolipídios deixam de interagir com as respectivas proteínas e também passam a assumir a conformação HEX II, ao associarem-se entre si. Dessa forma, o choque térmico é responsável pela alteração da permeabilidade celular, permitindo o influxo de íons como cálcio e sódio, e conseqüentemente, alterando a atividade metabólica da célula, onde há uma redução e uma série de transformações secundárias (Watson & Morris, 1987).

Segundo Quinn (1985), a relação entre a afinidade hidrofóbica e hidrofílica dentro das moléculas (natureza do fosfolipídio), a quantidade de água e solutos no meio extracelular e a temperatura são os principais responsáveis pela tendência de formação de duplas camadas lipídicas, ou da fase HEX II, ao longo da membrana dos espermatozóides. Além disso, essa alteração na configuração desses lipídios, resultado da alteração física da membrana durante o resfriamento, pode ser transitória ou permanente, dependendo da natureza das moléculas envolvidas.

Segundo Holt (2000 a), a fusogenicidade da membrana e a resposta aos mecanismos transdutores podem ser afetados pelas alterações na organização das membranas lipídicas, ao alterarem as propriedades cinéticas das enzimas da membrana plasmática. Essas alterações levariam a uma redução na longevidade dos espermatozóides após o descongelamento, pela capacitação acelerada induzida pela alteração enzimática estabelecida durante o resfriamento (Watson, 1995; Thomas et al., 2006).

Thomas et al. (2006) compararam diferenças entre a capacitação induzida artificialmente com espermatozóides capacitados prematuramente devido ao processo de criopreservação. Verificaram que o processo de capacitação induzida por

substância como cafeínas e AMP cíclico, está relacionado com a fosforilação de proteínas de membrana (Proteínas quinases) e da tirosina, que por sua vez, reagem aumentando a vesiculação da membrana acrossomal e aumentando a permeabilidade celular.

A capacitação induzida pelo processo de criopreservação dos espermatozóides pode estar relacionada com mecanismos sinalizadores alternativos, como a ativação de proteínas quinases (MAP), que são ativadas devido à fosforilação de treoninas e tirosinas específicas, causada pelo estresse osmótico induzido pelo processo de congelamento. Dessa forma, os autores concluíram que o padrão de fosforilação de proteínas observadas na capacitação artificial, não são os mesmos observados nos espermatozóides congelados e descongelados.

Santos (1994) objetivou, em seus estudos, avaliar as taxas e a regularidade no resfriamento do sêmen de jumentos, quanto à sua longevidade quando mantidos a 5° C. Para isso, resfriou amostras de sêmen oriundas de 36 ejaculados de 6 animais, diluídas em leite em pó desnatado, utilizando aparelhos computadorizados apropriados para o resfriamento de embriões e um refrigerador, que proporcionou curvas de resfriamento de -0,3, -0,6, -1,0° C por minuto. Concluiu que o sêmen de jumento suporta de forma mais satisfatória taxas de resfriamento mais abruptas (-0,6 e -1,0° C por minuto), quando comparado ao sêmen de equínos, cujo a taxa ideal não deve ultrapassar -0,3° C por minuto.

Segundo Fürst et al. (2003), o resfriamento de sêmen antes do congelamento é importante para a congelabilidade do sêmen equino, por manter a integridade funcional e estrutural da membrana plasmática e a longevidade, quando avaliado *in vitro*. Em seu experimento, utilizaram uma curva de resfriamento pré-estabelecida, atenuando o resfriamento entre 18 e 8° C, faixa de temperatura considerada crítica devido à ocorrência de choque térmico de membrana. Concluíram que o resfriamento de uma hora melhora a congelabilidade do sêmen equino.

O resfriamento do sêmen equino antes do congelamento foi estudado por Snoeck (2003), utilizando meios crioprotetores à base de lactose-gema de ovo, contendo, como crioprotetor, o etilenoglicol ou a acetamida, associados a metilcelulose e trealose. Durante o procedimento, submeteu as amostras a protocolos com e sem resfriamento prévio. O congelamento do sêmen com resfriamento baseou-se na submissão do mesmo à temperatura de geladeira (5° C), por duas horas e meia,

com taxa de resfriamento de $-0,13^{\circ}\text{ C/min}$. O procedimento sem resfriamento, baseou-se na submissão do sêmen diretamente ao congelamento, ou seja, sem resfriamento prévio. Observou-se que não houve diferenças quanto à motilidade espermática pós-descongelamento, comparando os protocolos de curva de congelamento rápido (sem resfriamento prévio) com o protocolo de curva de congelamento lento (com resfriamento prévio). No entanto, houve tendência em preservar a funcionalidade e estrutura da célula no protocolo com resfriamento prévio.

Alguns diluidores de sêmen vêm sendo testados para os diferentes procedimentos. Assim, o leite desnatado em pó, é rotineiramente utilizado, dentro de procedimentos de resfriamento de sêmen, para transporte e para centrifugação. O mecanismo de ação do mesmo sobre a qualidade espermática ainda não é conhecido, porém trata-se de um fator ligado à presença de proteínas que, possivelmente estabilizam os fosfolipídios de membrana durante o resfriamento. Por outro lado, a gema de ovo mostrou importantes resultados na prevenção de danos do choque térmico, possivelmente devido à presença de fosfolipídios de baixo peso molecular, que protegem os constituintes da membrana espermática, sem alterar a sua composição (Medeiros et al., 2002).

2.1.2. Centrifugação

Rotineiramente, a centrifugação do sêmen equino a ser criopreservado deve ser realizada, para aumentar a concentração espermática e para retirar o plasma seminal.

A força gravitacional utilizada na centrifugação do sêmen equino vem variando bastante, segundo diversos autores. Papa et al. (1981) observaram que centrifugações acima de 1000 G por até 10 minutos não interferem nas características das células espermáticas, após o descongelamento das mesmas. Adicionalmente, a centrifugação mantém uma longevidade satisfatória, descrita em 192 horas de observação, quando o mesmo é armazenado a 2° C .

Juliani et al. (2003) utilizaram em seus experimentos a força centrífuga de 400 G por 12 minutos, obtendo resultados considerados positivos para viabilidade da criopreservação do sêmen de garanhões. No entanto, Dell'Aqua Júnior (2000)

considera que a centrifugação do sêmen eqüino a 600 G por 10 minutos apresenta recuperação espermática que chega a 87% da quantia inicial, sem alterações na motilidade espermática, no vigor espermático e na integridade de membrana dos espermatozóides.

2.1.3. Tempo de equilíbrio com o crioprotetor

O tempo de equilíbrio entre o crioprotetor e os espermatozóides é o intervalo necessário para que o crioprotetor penetre na célula espermática, caso seja sua função, desidratando-a e alterando o meio intracelular e extracelular, a fim de protegê-la durante o processo de criopreservação. Para Ohata et al. (2005), o tempo de equilíbrio é importante para criopreservação do sêmen suíno, por manter melhor a integridade acrossomal e dar maior longevidade às células, apesar de não haver diferenças quanto à motilidade progressiva no pós-descongelamento. Paralelamente, Fürst et al. (2003) observaram que o tempo de equilíbrio de 60 minutos melhoraria a congelabilidade do sêmen eqüino, desde que associada à curva de resfriamento brando, proposto em seu trabalho.

Por outro lado, outros autores observaram que o tempo de equilíbrio extenso do sêmen com o glicerol não altera a congelabilidade do mesmo, quando comparado a protocolos em que esse intervalo não existe. Fabbrocini et al. (2000) observaram que a adição fracionada de glicerol, reduzindo o tempo de equilíbrio no pré-congelamento, não interferiu na qualidade espermática do sêmen de búfalos congelado e descongelado. Berndston & Foote (1969) observaram que, mesmo com intervalo de 10 segundos entre a adição do glicerol e o congelamento do sêmen de bovinos, não havia diferenças na qualidade espermática, na avaliação pós-descongelamento. Mais recentemente, Snoeck et al. (2003) argumentaram em seus estudos que, a presença ou não do glicerol, duas horas antes do congelamento de sêmen de garanhões, não ocasionou diferenças na qualidade espermática no pós-descongelamento. No entanto, os autores concluem que triagens *in vivo* de fertilidade são necessárias para avaliar se há ou não efeito tóxico causado pelo longo intervalo de exposição ao glicerol. Esses efeitos poderiam não ser observados nos testes de avaliações *in vitro*, utilizados em seus experimentos.

2.1.4. Crio-injúria

Segundo Medeiros et al. (2002), à medida que se submete o sêmen a temperaturas inferiores a 5° C, a água presente nos meios, intra e extracelulares iniciam processo de congelamento. Porém, a essa temperatura, o sêmen ainda permanece em estado de profundo resfriamento. Entre -5 e -10° C, a água inicia a formação do gelo apenas no meio extracelular, sendo que no interior da célula, a mesma permanece em estado de resfriamento intenso. Esse mecanismo é importante para o processo de desidratação celular, uma vez que a solução extracelular remanescente ficaria hipertônica, o que promoveria a saída de água do interior celular (Mazur, 1984; Amann & Pickett, 1987; Crabo, 2001).

A desidratação é importante, principalmente para impedir a formação de cristais de gelo no interior da célula, o que poderia afetar a integridade estrutural da mesma. No entanto, a desidratação intensa da célula espermática acarreta danos celulares relevantes, como desnaturação de macromoléculas e colapso irreversível da membrana plasmática. Por outro lado, taxas de congelamento rápidas tendem a formar cristais de gelo no interior da célula, uma vez que o tempo de desidratação é lento, e a célula não perde a água suficiente para que isso ocorra (Medeiros et al. 2002).

Segundo Neild et al. (2003), a proteção dos espermatozóides eqüinos aos danos causados pelo processo de criopreservação deve se iniciar antes da centrifugação e antes do início da etapa de resfriamento. Adicionalmente, os mesmos autores observaram que os danos celulares são causados pelo congelamento e descongelamento, o que pode ser avaliado pela presença de células espermáticas vivas, porém com adiantado processo de capacitação e com sinais de reação acrossômica induzida.

Para Watson (1995), a criopreservação pode provocar dois tipos de danos, de acordo com a velocidade de congelamento a que as células são submetidas. Diante de congelamento rápido, ocorre a formação de cristais de gelo intracelulares, ou seja, antes que a água saia da célula espermática, o que provocaria danos diretos, à membrana plasmática. Por outro lado, diante de congelamentos lentos, a célula espermática permaneceria muito tempo em exposição a meios hipertônicos (extracelulares), oriundos do congelamento heterogêneo, que ocorre a partir da

formação dos cristais de gelo fora da célula. Isso poderia provocar desidratação intensa e alterações no metabolismo celular.

Os danos celulares mais significativos provocados pelo processo de criopreservação são conseqüências não só do resfriamento (choque térmico) e do congelamento em si, mas também dos procedimentos de descongelamento (Holt, 2000 a). Assim, o grande desafio das células criopreservadas é suportar as mudanças de temperaturas intermediárias, durante o processo de congelamento e de descongelamento (Mazur, 1984).

2.1.5. Crioprotetores.

Uma das principais atribuições relacionadas à qualidade dos crioprotetores é sua afinidade com a água e a habilidade de se formar pontes de Hidrogênio (Keith, 1998). Dessa forma, os crioprotetores devem alterar o meio extracelular dos espermatozóides, bem como o metabolismo celular dos mesmos, para se adequar aos fenômenos provocados pelo resfriamento e pelo congelamento (Amann & Pickett, 1987). Adicionalmente, devem desencadear o menor efeito tóxico sobre as células espermáticas e possuir pH que não interfira no metabolismo da célula, estando o mais possível próximo ao neutro.

Diversos estudos vêm mostrando a eficiência de muitos crioprotetores no congelamento do sêmen de eqüinos, uma vez que o glicerol pode apresentar elevada toxicidade e, conseqüentemente, falhar em preservar a viabilidade das células após o congelamento (Cotorelo & Henry, 2002). Bittencourt et al. (2004) demonstraram que a utilização do etilenoglicol (7%), associado ou não ao EDTA, apresentaram resultados inferiores, quando comparado ao glicerol (7%), associado ao não ao EDTA, no sêmen criopreservado de caprinos (10 % de motilidade espermática (MT) para etilenoglicol; 12% MT para etilenoglicol com EDTA vs. 51 % MT para glicerol; 61% MT para glicerol com EDTA). No entanto, observaram, por meio da avaliação morfológica do sêmen, que a criopreservação com etilenoglicol preserva melhor as características celulares dos espermatozóides, enquanto os índices de patologia espermática no sêmen criopreservado com glicerol são altos (58,0 % e 83,88 % vs. 13,50 % e 19,20 %).

Cotorelo (2002) avaliou a utilização de etilenoglicol na criopreservação do sêmen de eqüinos, associado ou não ao glicerol, tendo, como controle, o

congelamento padrão utilizando o glicerol como crioprotetor. Nesse sentido, criopreservou 2 ejaculados de 10 garanhões, utilizando meios associados (etilenoglicol-glicerol, nas proporções 4:1; 3:2; 2,5:2,5; 2:3; e 1:4), além de glicerol e etilenoglicol utilizados isoladamente, na proporção de 5 %. O autor verificou que a proporção de 4 % de etilenoglicol para 1 % de glicerol (4:1) e a utilização de 5 % de glicerol, apresentaram os melhores resultados quanto à motilidade espermática progressiva (33,3 % e 36,2 %, respectivamente) e integridade acrossomal (39,6 % e 47,4 %, respectivamente) dos espermatozóides, após o descongelamento dos mesmos.

Mantovani et al. (2002) avaliaram a eficiência do etilenoglicol na criopreservação do sêmen equino e concluíram que este crioprotetor poderia ser uma alternativa aos meios com glicerol, quando utilizado em concentrações iguais ou menores que 3% na composição do diluidor que contenha gema de ovo, onde maiores concentrações de etilenoglicol levariam a efeitos deletérios sobre a sobrevivência dos espermatozóides, possivelmente devido aos efeitos tóxicos causados pelos mesmos.

Medeiros et al. (2003) estudaram o efeito de crioprotetores à base de amidas, comparando com o glicerol, na congelabilidade de sêmen de garanhões, avaliando parâmetros como integridade acrossomal, por meio de técnicas de fluorescência e microscopia eletrônica, correlacionando-as. Os autores observaram que, congelando o sêmen com dimetilformamida a 5 %, os resultados são melhores quando comparadas à utilização de outras amidas e ao glicerol a 5 % (55,5 % de acrossomas íntegros com dimetilformamida, 42 % com glicerol a 5 %). Concluíram que a melhor eficiência das amidas sobre o glicerol estaria relacionada ao menor peso molecular das primeiras, o que conferiria melhor taxa de penetração através da membrana plasmática e acrossomal, o que, por sua vez, causaria menor desequilíbrio osmótico à célula em questão.

No entanto, Keith (1998) avaliou o efeito de crioprotetores alternativos para o glicerol na congelabilidade do sêmen equino e observou que o glicerol apresenta melhores taxas de congelabilidade (60,5 % de motilidade espermática total), quando comparado a crioprotetores como acetamidas (8,4 %), metilacetamidas (20,4 %), formamidas (4,6 %), metilformamidas (40,3 %) e dimetilformamidas (36,7 %).

Chenier et al. (1998) avaliaram a utilização de diversos agentes crioprotetores (dimetilsulfóxido, glicerol, etilenoglicol, dietilenoglicol e propilenoglicol), na

congelabilidade do sêmen de garanhões. Em seus estudos, observaram que os melhores resultados, quanto à motilidade espermática total após descongelamento, eram obtidos com o glicerol e com dimetilsulfóxido, não havendo diferenças entre ambos os tratamentos. No entanto, observaram que o uso de etilenoglicol diminui a motilidade espermática após o descongelamento. O sêmen criopreservado com dietilenoglicol e propilenoglicol apresentaram os parâmetros de motilidade e viabilidade espermática mais baixos que os outros crioprotetores utilizados pelos autores.

Oliveira et al. (2006) avaliaram a combinação de dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DF), dimetilacetamida (DA) e glicerol (GLI) na congelabilidade do sêmen de jumentos. Para isso, propuseram os seguintes tratamentos: 2 % de DMSO/2 % de DF; 3 % de DF; 2 % de DA/2 % de GLI; 3 % de DA; 3 % de GLI/2 % de DF; e 3% de DMSO/2% de GLI. Os autores observaram que as associações de crioprotetores propostas foram eficientes na proteção da célula espermática durante a criopreservação, por apresentarem valores de motilidade espermática progressiva (36,5 a 43,5 %), motilidade espermática total (61,8 a 69,4 %), e integridade de membrana (41,1 a 48,6 %) satisfatórios e sem diferenças entre os valores médios dos diferentes protocolos de congelamento. Entretanto, em uma triagem de fertilidade, não obtiveram nenhuma prenhez nas jumentas inseminadas com os protocolos de sêmen criopreservados.

Storey et al. (1998) propuseram a associação de açúcares, como a trealose na criopreservação de sêmen de ratos. Baseando-se no fato de a molécula de glicerol ser um poliálcool (com 6 grupos funcionais hidroxila), com alta afinidade pela água, entenderam que sua estrutura molecular poderia não penetrar a membrana plasmática de forma tão eficiente e sem causar danos, quando comparado à ação da trealose ou da rafinose. Essas últimas também seriam poliálcoois capazes de desidratar a célula espermática, porém mais lipossolúveis, o que contribuiria para poucas modificações na estrutura de membrana dos espermatozoides, mesmo esses sendo agentes não permeáveis. De fato, os melhores resultados de motilidade espermática total obtidos pós-descongelamento referiam-se à combinação de 6% de glicerol com 7,5% de trealose (46%) ou 7,5% de rafinose (40%).

Juliani et al. (2003) avaliaram a associação de trealose (0,165%) ou rafinose (0,15%) com acetamidas (2,5; 3,5 e 5%) e metilcelulose (0,5%) na criopreservação de sêmen equino, comparando com a congelabilidade de diluidores com glicerol a

5%, e verificaram que os valores de motilidade espermática progressiva retilínea no sêmen congelado, com trealose e 5% de acetamida, foram superiores aos do sêmen congelado com glicerol 5% (57,5%, vs. 41,8%). No entanto, os valores de integridade de membrana (23 vs. 17,88) e fluorescência (38,9 vs. 36,8) não diferiram entre si, apesar da tendência de valores mais favoráveis no tratamento proposto pelo autor.

Recentemente, estudos vêm avaliando diluidores de congelamento (MP 50; Papa et al. 2003) constituídos de açúcares (glicose, lactose e rafinose), tampões (citrato de sódio, citrato de potássio e EDTA), gema de ovo, leite em pó desnatado, substratos para cultivo celular, antibióticos e crioprotetores penetrantes (glicerol a 3% e dimetilformamida a 2%). Segundo esses autores, o sêmen de equinos congelado com MP 50 apresenta características físicas semelhantes a sêmen “*in natura*” (motilidade espermática total de 85, 6% a 89,6 %) e chegam a apresentar 75% de taxa de prenhez em testes de fertilidade *in vivo*.

Rossi et al. (2003) utilizaram o MP 50 na congelabilidade do sêmen equino testando a combinação de outros crioprotetores (dimetilformamida a 2% + DMSO a 2%; dimetilformamida a 3%; metilformamida a 2% + glicerol a 2%; dimetilacetamida a 2% + glicerol a 2%; metilformamida a 3%; dimetilacetamida a 3%; MP 50 original) e não observaram diferenças dentro dos parâmetros analisados (motilidade espermática progressiva retilínea e progressiva total e integridade de membrana) entre os diferentes protocolos de congelamento.

O uso de diluidor TRIS-gema de ovo, sem a presença de outros crioprotetores, não promoveu a proteção adequada à estrutura celular durante a criopreservação de sêmen de garanhões, nos estudos de Guay & Rondeau (1981). Os autores comprovaram a necessidade do uso do glicerol como crioprotetor, ao adicionarem soluções contendo o mesmo agente a 8 % (diluição final de 5,3 % de glicerol) e observaram que o glicerol preservou melhor a motilidade e a viabilidade das células espermáticas de garanhões durante o congelamento das mesmas.

2.1.5.1. Efeito do Glicerol na criopreservação do sêmen

A concentração do glicerol necessária para criopreservação do sêmen equino é objetivo de diversos estudos, variando de 2,5 a 9 % do meio diluidor (Amann & Pickett 1987, Samper & Morris, 1998).

O glicerol é uma substância classificada como álcool porque os grupos hidroxil presentes na sua composição são compostos por três moléculas de carbono. (Keith, 1998, Storey et al., 1998). Quanto à sua forma de atuação, é classificado como agente crioprotetor permeável, por atuar dentro do citoplasma celular (Holt, 2000 a), porém com possíveis atuações extracelulares (Berndston & Foote, 1969, Amann & Pickett, 1987). O mecanismo de ação desse agente está relacionado principalmente à inibição da formação dos cristais de gelo no interior ou em locais adjacentes às células (Fabbrocini et al., 2000; Nishikawa et al., 1975).

Segundo Keith (1998), o glicerol contém três grupos hidroxil funcionais (os quais possuem moléculas de oxigênio), que podem aceitar o hidrogênio da molécula de água em 6 diferentes lugares. A habilidade do crioprotetor aumenta com o número de grupos funcionais. Isso pode explicar porque o glicerol confere mais proteção às células, do que as amidas, as quais possuem apenas 2 grupos funcionais (as aminas, que contêm nitrogênio, e o ácido carboxílico, que contêm oxigênio). Por ser um poliálcool com alta afinidade pela água, o glicerol tem a capacidade de provocar desidratação eficiente na célula, permitindo o congelamento sem a formação de cristais de gelo, o que seria letal à célula em questão (Storey et al., 1998). Por outro lado, Medeiros et al. (2002) relataram que a desidratação provocada pelo glicerol é insuficiente, a ponto de causar danos similares aos desencadeados pelo processo de criopreservação.

O glicerol pode produzir efeitos considerados tóxicos para as células espermáticas. Hammersted & Graham (1992) relataram que os efeitos tóxicos relacionados a esse crioprotetor são o estresse osmótico, associado à alteração da concentração de substâncias no interior e no exterior das células espermáticas, a modificação da membrana plasmática espermática, associada à sua habilidade de penetração pelos fosfolípidos, e a capacidade de ativar diversos mensageiros celulares, pela ligação a proteínas da membrana plasmática. Hammersted et al. (1990) relataram que o glicerol possui a capacidade de alterar o status bioenergético dos espermatozoides, possivelmente interferindo no balanço entre a síntese de ATP e a utilização do mesmo. Dessa forma, se um déficit de ATP ocorre, durante o processo de resfriamento e congelamento, o controle metabólico de íons no interior da célula é alterado e conseqüentemente, ocorrerá a ativação de diversas fosfolipases e proteases, o que leva a danos irreversíveis à célula.

Para Holt (2000 b) a concentração ideal de glicerol para criopreservação espermática e as conseqüências dos efeitos tóxicos desencadeado pelo mesmo, varia entre as diferentes espécies animais. O autor comenta que, enquanto no sêmen bovino, as concentrações variam de 4 a 8% de glicerol, o sêmen de suínos não toleram concentrações acima de 3% , enquanto o sêmen de ratos não deve ser congelado com mais 1,75% de glicerol na composição do meio.

Ball & Vo (2001) avaliaram a tolerância dos espermatozóides de eqüinos não congelados ao estresse osmótico provocados por diferentes crioprotetores (glicerol, dimetilsulfóxido, etilenoglicol e propilenoglicol). Adicionalmente, procuraram avaliar o efeito da retirada do mesmo sobre a integridade espermática, observando motilidade espermática total, integridade de membrana e de acrossoma, além de funcionalidade das mitocôndrias. Observaram que o glicerol é o crioprotetor que apresenta maiores danos osmóticos às células espermáticas, dentre os crioprotetores avaliados, sugerindo que crioprotetores alternativos podem ser utilizados na criopreservação do sêmen de garanhões.

Para Noiles et al. (1997), a sensibilidade dos espermatozóides aos danos causados pelo processo de congelamento ocorre pela baixa resposta das células ao estresse osmótico induzido pelo processo. Os autores utilizaram sêmen de rato para a avaliação de condutividade hidráulica e caracterização de proteínas do citoesqueleto associados à membrana plasmática e verificaram que, ao destruir tais proteínas, a resposta das células a meios hiposmóticos é tão intensa quanto a observada em sêmen de humanos e bovinos. Portanto, essas proteínas estão associadas à alta sensibilidade que essas células apresentam em relação ao processo de criopreservação. Para os autores, a presença do glicerol destrói essas proteínas, aumentando a resistência das células ao processo de criopreservação. Entretanto, a destruição das mesmas pode alterar os mecanismos sinalizadores da célula, o que pode vir a prejudicar a capacidade de fertilização na tuba uterina (Thomas et al., 2006).

Segundo Hammerstedt & Graham (1992), o efeito nocivo do glicerol está relacionado aos danos de membrana plasmática durante a penetração do mesmo ao interior das células, alteração no balanço osmótico, alterações na interação entre as células espermáticas e o trato reprodutivo feminino e alteração da fusão com o oócito

As concentrações de glicerol são assuntos freqüentes de pesquisas relacionadas à congelabilidade de sêmen de garanhões. Nagase et al. (1967)

concluíram que a concentração de glicerol mais adequada para congelamento de sêmen de garanhões é de 3,5%, tendo trabalhado com concentrações de 1,75% e 7%. Entretanto, Nishikawa et al. (1975), em estudo que envolveu 2 garanhões e 5 concentrações de glicerol no diluidor de congelamento (0, 1, 2, 3, 4 e 5%), concluíram que os melhores resultados no congelamento de sêmen nessa espécie foi de 5 % de glicerol no meio diluidor. Adicionalmente, os mesmos autores observaram que o tempo de equilíbrio reduzido (18 a 32 segundos) do sêmen com o meio crioprotetor não interfere na qualidade espermática no pós descongelamento, quando comparado com protocolos de tempo de equilíbrio de 1 hora (49% com tempo de equilíbrio reduzido vs. 51% com tempo de equilíbrio de 1 hora).

Entretanto, Watson (1979) concluiu em seus estudos que a concentração de glicerol no meio de congelamento de sêmen depende da espécie animal, além da taxa de resfriamento e congelamento, de outros componentes da meio diluidor e dos métodos de envase do sêmen. A concentração de glicerol nos diluidores de congelamento do sêmen equino deve ser menor que as concentrações utilizadas nos diluidores de sêmen bovino. Nagase et al. (1967) recomendou concentrações de 3,5%, e tempo de equilíbrio de 5 horas a 5°C e Nishkawa et al. (1975) recomendaram concentrações de 5% de glicerol e tempo de equilíbrio de 18 segundos para o congelamento do sêmen equino.

Cochran et al. (1984) realizaram estudos para avaliar o efeito de três diferentes concentrações de glicerol, duas taxas de congelamento e duas temperaturas de descongelamento na motilidade espermática de garanhões. Os melhores resultados em termos de motilidade no pós descongelamento se deu com concentrações de glicerol de 4 % (comparado a diluidores com 2 e 8 % de glicerol), porém sem interação entre os tratamentos ($p > 0,05$). Adicionalmente, os autores observaram que a adição de glicerol, antes ou após o resfriamento do sêmen a 5° C, não melhorou a motilidade espermática do sêmen após o descongelamento.

Guay & Rondeau (1981) relataram que concentrações de glicerol entre 0 e 8% não afetaram a motilidade, viabilidade e integridade estrutural dos espermatozoides de garanhões criopreservados. Entretanto, estudos nesse sentido almejam registrar a concentração ideal de glicerol, que não induza os efeitos tóxicos sobre as células, ao mesmo tempo as protegem dos danos causados pelo processo de criopreservação.

Burns & Reasner (1995), avaliaram sêmen de 3 garanhões, criopreservados com diferentes concentrações de glicerol associado a sacarose e leite desidratado, com 0, 1, 2, 3 e 4% de glicerol na composição e observaram, dentro de avaliações computadorizadas do sêmen após o descongelamento, que a criopreservação utilizando 2% de glicerol proporcionou máxima proteção durante o processo de criopreservação, com o mínimos efeitos deletérios à célula espermática.

2.1.5.2. Adição fracionada de Glicerol durante o processo de criopreservação.

Protocolos de congelamento em que o glicerol é adicionado de forma fracionada ou dissociada ao sêmen vêm demonstrando resultados promissores, no congelamento de sêmen de diversas espécies animais. Uma razão para isso é que, ao diminuir o tempo de exposição do glicerol ao sêmen, antes do congelamento, ou durante o resfriamento do sêmen, os efeitos tóxicos causados pelo mesmo seriam minimizados (Silva et al., 2006).

Snoeck et al. (2003), ao estudarem o efeito de diferentes diluidores no transporte do sêmen entre o local de coleta e a central de congelamento, verificaram que a presença do glicerol durante o resfriamento não interfere na congelabilidade do sêmen equino. Para isso, padronizaram o transporte em um recipiente isotérmico, contendo uma fonte de frio (gelo reciclável), pelo período de duas horas. Os autores salientam a necessidade de estudos de fertilidade *in vivo* para o sêmen transportado com glicerol, devido ao efeito tóxico que o mesmo apresenta às células espermáticas, o que pode mascarar a verdadeira capacidade fecundante dessas células.

Guay & Rondeau (1981) estudaram o efeito do glicerol na motilidade, e na viabilidade espermática, antes e após o congelamento do sêmen equino, e verificaram que a inclusão fracionada do glicerol ao sêmen preservou a motilidade e viabilidade das células espermáticas após o descongelamento.

Berndston & Foote (1969) utilizaram sêmen bovino para avaliar diferentes concentrações de glicerol, em diferentes tempos de equilíbrio (6 horas, 30 minutos e 10 segundos) e observaram que o tempo de exposição mínimo (10 segundos), melhorou a qualidade espermática em termos de motilidade, concluindo que, quanto menor o tempo de exposição ao glicerol, menor também serão os efeitos tóxicos desencadeados por este agente no interior da célula.

Fabbrocini et al. (2000) realizaram estudos com sêmen de búfalos, em que meios de congelamento com maiores concentrações de glicerol foram adicionados, em diferentes tempos de equilíbrio (adição fracionada). Inicialmente, as amostras foram diluídas em meio contendo menos glicerol (3%), a 28° C. Após 1, 3 e 5 horas, durante o resfriamento, houve a segunda diluição (com meio contendo 11 % de glicerol), a fim de se obter uma concentração final de 6 a 7% de glicerol. Os resultados registrados pelos autores mostram que, à medida que o tempo de equilíbrio aumenta, a motilidade espermática progressiva retilínea após o congelamento/descongelamento decresce.

Por outro lado, Vidament et al. (2000) concluíram que a adição de glicerol, logo após centrifugação a 22°C, seguida de um resfriamento lento a 4°C, pelo período de uma hora, melhorou a motilidade espermática após o descongelamento, quando comparado com protocolos em que a centrifugação e a adição do crioprotetor fora realizada a 4°C, com 30 e 80 minutos de tempo de equilíbrio, e com congelamento direto a partir de 22°C.

Silva et al. (2006) avaliaram a qualidade de sêmen canino congelado diante da adição de glicerol, à temperatura ambiente (27° C), comparada com a adição do glicerol com sêmen resfriado a 4° C. No entanto, não observaram diferenças na avaliação do sêmen congelado pelos protocolos empregados (motilidade, morfologia, integridade de acrossoma, funcionalidade de membrana plasmática ou longevidade dos espermatozóides). Quanto ao tempo de equilíbrio do sêmen com o crioprotetor, os autores salientam não ser necessário para se alcançar o sucesso na congelabilidade do sêmen nessa espécie animal.

2.2. Descongelamento do sêmen congelado

O descongelamento do sêmen de garanhões vem sendo discutido por diversos autores. Usualmente dois protocolos são propostos. O primeiro é manter o sêmen a uma temperatura de 37° C por 30 segundos. O segundo foi proposto inicialmente por Cristanelli et al. (1984) que propuseram descongelamento de sêmen a 75°C por 7 segundos. Estudos recentes (Zúccari, 1998; Fürst et al., 2003) demonstraram que a metodologia descrita Cristanelli et al. (1984) repercute em melhores resultados nas avaliações do teste de termoresistência.

Adicionalmente, outros estudos buscam avaliar outras temperaturas no descongelamento do sêmen de garanhões. Dell'Aqua Júnior (2000) observou que o descongelamento a 65° C por 6 segundos proporcionou melhores resultados nas alíquotas congeladas em palhetas de 0,25 e 0,5 mL.

2.3. Testes Complementares.

2.3.1. Teste de Termoresistência (TTR).

O teste de termoresistência do sêmen tem a finalidade de avaliar a longevidade espermática. Segundo preconizado pelo CBRA (1998), as células espermáticas de ejaculados de garanhões devem permanecer incubadas a 38° C, por até 180 minutos, quando ainda devem apresentar o mínimo de células móveis (30% de motilidade espermática total e vigor espermático 3).

Para Zúccari (1998), o teste de termoresistência comumente empregado na avaliação funcional de sêmen congelado de bovinos não deve ser aplicado ao sêmen congelado de eqüinos. Em seu estudo, foi observado que a incubação do sêmen após 240 minutos, a 37° C, apresenta quantidades ínfimas de espermatozóides móveis, estando o vigor espermático abaixo dos índices recomendados (2 % de células com motilidade espermática e vigor espermático 1). A autora observou que, aos 90 minutos de incubação, as células apresentavam 20% de motilidade espermática e vigor espermático 2 e, aos 120 minutos, 10 % de motilidade espermática e vigor espermático 2, concluindo que o tempo ideal para avaliação do sêmen equino congelado e descongelado por meio do teste de termoresistência seria de 120 minutos, pois, apesar de quantidades baixas de espermatozóides móveis, o vigor espermático encontrou-se dentro de limites aceitáveis.

Fürst et al. (2003) empregaram o teste de 90 minutos, com avaliações em tempo 0, 20, 40, 60 e 90 minutos, para análise da longevidade dos espermatozóides de garanhões, concluindo que a longevidade espermática possui correlação com o protocolo de descongelamento e resfriamento pré-congelamento, verificando que procedimentos de congelamento que utilizam curva de resfriamento lento e descongelamento a 75° C por 7 segundos, tendem a apresentar maior tempo de viabilidade espermática no teste em questão.

2.3.2. Teste supravital com Eosina-Negrosina

A estimativa de percentual de células espermáticas com membranas íntegras pode ser fornecida pelo teste de coloração eosina com associação à negrosina (supravital), no sêmen não congelado. Segundo Melo (1999), a quantificação de células vivas pelo método de coloração eosina-negrosina apresenta relações com a avaliação de motilidade espermática total e motilidade espermática progressiva retilínea no sêmen de garanhões mantidos sob refrigeração, por até 6 dias ($r = 0,75$ e $0,71$).

No entanto, sua principal aplicabilidade é a avaliação da integridade de membrana, observando que células mortas (com lesões de membrana severas) apresentam núcleos corados pela eosina, permanecendo de cor avermelhada, e as células vivas, incolores, durante a leitura em microscopia óptica.

No entanto, a utilização da coloração supravital na análise do sêmen congelado pode não apresentar resultados satisfatórios, devido à pouca coloração nesse tipo de sêmen. Para isso, seria necessária a utilização de eosina não associada, em concentrações superiores a 5%, para indicar os danos de membranas plasmáticas causados pelo processo de criopreservação (Guay & Rondeau, 1981).

2.3.3. Teste Hiposmótico (HOST)

Diversos testes têm sido empregados na avaliação da estrutura e função de membrana plasmática dos espermatozóides. Entretanto, o teste Hiposmótico mostra-se uma alternativa de execução e leitura simples, facilmente executável. Trata-se de uma avaliação funcional da membrana plasmática da célula espermática, onde se observa a habilidade da célula diante de situações de estresse osmótico, quando a mesma é submetida a soluções de baixa osmolaridade (Jeyndran et al., 1984), em que os espermatozóides viáveis sofrem um processo de inchaço, a fim de, se estabelecer o equilíbrio osmótico, levando a um dobramento ou enrolamento da cauda, característico (Neild et al., 2003).

Melo et al. (2005) caracterizaram as alterações de cauda dos espermatozóides de eqüinos submetidos a meios hiposmóticos com diferentes solutos e osmolaridades. Para isso, utilizaram soluções à base de frutose, sacarose, cloreto de sódio, em osmolaridades de 50 e 100 mOsm/Kg, para cada soluto. Além disso, utilizaram água

destilada em duas proporções (1 parte de sêmen para 10 partes de água destilada; e 1 parte de sêmen para 20 partes de água destilada) e observaram que o percentual de formas reativas variou pouco entre as soluções trabalhadas. No entanto, o percentual de caudas fortemente enroladas foi maior, quando se empregou água destilada. Os autores concluíram que a incubação em água destilada é a mais indicada para a realização de teste hiposmótico, por apresentar maior facilidade na leitura dos dados.

Assim, diversos autores vêm buscando estudar protocolos ideais para as diferentes espécies animais, em que a manipulação do sêmen se faz necessária. Neild et al. (1999) avaliaram composição de meios hiposmóticos à base de frutose, sacarose e lactose, em diversos graus de osmolaridades (300, 150, 100, 50 e 25 mOsm/kg) e observaram que os melhores resultados eram obtidos com as soluções de frutose, sacarose e lactose 100, 50 e 25 mOsm. Melo (1999) avaliou diferentes soluções hiposmóticas (frutose, sacarose, citrato de sódio e cloreto de sódio), com diferentes osmolaridades (300, 250, 200, 150, 100 e 50 mOsm/kg), na busca do procedimento ideal para se executar o teste hiposmótico no sêmen de garanhões, e observou que, mediante soluções de sacarose, a 100 mOsm/kg, o sêmen equino “in natura” e resfriado apresentou maior reatividade dos espermatozoides.

Por outro lado, alguns autores buscam formular o melhor protocolo para avaliação de integridade funcional de membrana para sêmen equino congelado e descongelado. Alves et al. (2005) observaram que a utilização de água destilada (na proporção de 1 parte de sêmen para 10 partes de água destilada) apresentou melhor reatividade ao teste, quando comparado com diferentes solutos (sacarose/cloreto de sódio a 50 e 100 mOsm; sacarose/citrato de sódio a 50 e 100 mOsm; frutose/cloreto de sódio a 50 e 100 mOsm; frutose/citrato de sódio a 50 e 100mOsm) e com a água destilada, na proporção de 1 parte de sêmen para 20 partes de água destilada.

Na mesma linha de pesquisa, Borges et al. (2005) compararam diferentes proporções de sêmen:água destilada, na busca do melhor protocolo para avaliação por teste hiposmótico de sêmen equino congelado. Para isso, testaram as proporções de uma parte de sêmen para 5, 10, 15, 20 e 25 partes de água destilada e observaram que a proporção de 1:15, apresentou maior reatividade ao teste ($31,5 \pm 3,6$), sendo a mais indicada para execução do teste Hiposmótico do sêmen equino congelado e descongelado.

Segundo Melo (1999), o teste hiposmótico apresenta alta correlação com outros testes complementares, como coloração supravital ($r = 0,70$), avaliações de

motilidade espermática progressiva retilínea e total ($r = 0,68$ e $0,64$) e avaliação de integridade acrossomal ($r = 0,66$). No entanto, tratam-se de testes complementares, que avaliam estruturas diferenciadas, não podendo ser excludentes. Por outro lado, os dados obtidos desses estudos demonstram que o teste hiposmótico é uma avaliação confiável da capacidade de fertilização dos espermatozóides.

Neild et al. (1999) observaram que a correlação entre o teste hiposmótico em sêmen de garanhões e as avaliações de motilidade espermática progressiva e células morfológicamente normais foram, respectivamente de $r = 0,26$ e $r = -0,22$, no sêmen congelado, e que essa correlação aumentou para $r = 0,75$ e $r = 0,51$, respectivamente, na avaliação do sêmen in natura. Os autores preconizaram a necessidade de novos estudos para avaliação por teste hiposmótico no sêmen congelado de garanhões.

2.3.4. Morfologia espermática

Apesar da divergência entre os autores, quanto à correlação entre aspectos morfológicos normais e taxa de congelabilidade, existem muitas diferenças morfológicas entre espermatozóides de diversas espécies animais que influencia de várias maneiras a taxa de fertilidade. Dentre essas diferenças, pode-se citar, principalmente, a forma acrossomal e o comprimento de flagelo dos espermatozóides que não necessariamente influenciaram os resultados de testes de fertilidade desenvolvidos por diferentes autores. Da mesma forma, é plausível observar que os espermatozóides de bovinos e suínos possuem formato de cabeça similar. No entanto, a cabeça dos espermatozóides de eqüinos possui formas de cones afiados, sendo considerados normais para as espécies supracitadas, não estando relacionados com a capacidade fecundante das mesmas. Por outro lado, aspectos funcionais e estruturais vêm sendo descritos por diversos autores, no intuito de justificar certas particularidades. Por exemplo, mesmo com formatos de cabeça similares, a sensibilidade dos espermatozóides suínos ao processo de criopreservação é muitas vezes maior quando comparada à dos espermatozóides bovinos (Holt, 2000 b).

Segundo Jasko (1990), há correlação positiva entre taxa de fertilidade e espermatozóides morfológicamente normais. Em seus estudos, observaram e classificaram os ejaculados de 99 garanhões durante duas estações de monta consecutivas e registraram correlação de $r = 0,34$ entre as características. Por outro lado, avaliando o sêmen de animais com maior percentual de defeitos espermáticos

maiores, observaram correlação negativa, de proporção similar ($r = -0,36$). Por análises de regressão múltiplas, os autores verificaram que ejaculados de sêmen com anormalidades de cabeça e gota citoplasmática proximal foram os principais responsáveis pela redução das taxas de fertilidade.

De acordo com Graham (1996), os sistemas de classificação morfológica dos espermatozóides de eqüinos não são padronizados entre diferentes estudos. Nesse sentido, o autor revela que as subdivisões em defeitos primários (que poderiam estar relacionados à má formação durante a espermiogênese) e defeitos secundários (que ocorreriam após a saída dos espermatozóides dos testículos), ou mesmo divisões em defeitos espermáticos maiores (associados a capacidade de fertilização do oócito) e menores (não associada a fertilização), não auxiliam no processo de padronização e convencionamento internacional. Segundo o autor, uma classificação específica à espécie poderia ser utilizada, onde o percentual de espermatozóides normais deveria ser no mínimo de 52%. Quanto às patologias espermáticas, a avaliação celular deveria ter padrões de, no máximo, 8% de anormalidades de cabeça (incluindo forma e defeitos de acrossoma); 3% de cabeça isolada; 11% de gota citoplasmática proximal; 8% de gota distal; 8% de defeitos de peça intermediária e 11% de anormalidades de cauda. Para o autor, altos índices de defeitos de cabeça, acrossoma e forma anormais de núcleo estão diretamente relacionados a baixas taxas de fertilidade.

Outros fatores podem estar associados ao aumento de incidência de patologias em um ejaculado. Dentre eles, o processo de criopreservação e o choque térmico, que de maneira direta ou indiretamente prejudicam a integridade da membrana plasmática e acrossomal. Entretanto, Santos (1994) observou que, mediante diferentes curvas de resfriamento de sêmen, os índices de anomalias morfológicas nos espermatozóides de jumentos não se alteram em relação aos dados coletados do sêmen “in natura”.

Volkman (1987) observou que o percentual de células com danos de acrossoma aumentariam após o processo de criopreservação do sêmen de eqüinos, independente do meio de centrifugação utilizado. Segundo o autor, os índices de fertilidade com sêmen eqüino congelado e descongelado estão associados com a qualidade física do sêmen e com a incidência de células morfolologicamente normais. Dessa forma, o processo de criopreservação estaria relacionado com a perda da capacidade fecundante da célula espermática em garanhões.**3.**

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Grupo experimental

Foram utilizados 2 garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idades entre 6 e 8 anos, em bom estado de condição corporal (escore 6 e 7, em escala de 0 a 10 descrito por Henneke et al., 1983), criados em regime de semi-confinamento (*Cynodom dactylon* cv. Tifton e ração concentrada). O experimento foi realizado no Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa/MG, Zona da Mata de Minas Gerais – Brasil. (20° 46' 23" latitude sul e 42° 5' 10" longitude oeste).

3.2. Amostras de sêmen

3.2.1. Coletas de sêmen

As coletas de sêmen foram realizadas por meio de vagina artificial (modelo “Botucatu”), utilizando uma égua em estro como manequim para a estimulação e execução da monta pelos garanhões. A vagina artificial foi previamente enchida com água a 48°C e ar, para proporcionar pressão adequada durante a introdução do pênis, e foi revestida por uma membrana plástica. Na extremidade posterior do equipamento, foi acoplado copo coletor isotérmico, revestido internamente com saco plástico graduado onde os ejaculados foram depositados, de acordo com protocolos de coletas preconizados por Amann & Pickett (1987).

3.2.2. Esgotamento de reservas extragonádicas dos animais em repouso sexual

Apenas um dos dois animais (ganhão 2) encontrava-se em repouso sexual, estando sem executar monta há mais de 2 meses, na ocasião do início do experimento. A reserva espermática extragonádica desse animal foi esgotada por meio de coletas diárias de sêmen, durante 6 dias consecutivos, mantendo o animal em repouso de um dia antes de iniciar o experimento. O ganhão 1 encontrava-se apto a entrar no experimento devido ao fato de estar sendo acasalado com éguas no Setor de Equideocultura, na ocasião do início do experimento.

3.2.3. Frequência de coletas

As coletas de sêmen destinadas ao congelamento foram realizadas em intervalos de dois dias para cada animal, sendo um animal por sessão de coleta. Totalizaram-se 6 ejaculados para o garanhão 1 e 5 ejaculados para o garanhão 2.

3.3. Avaliação do sêmen “in natura”

O sêmen recém coletado foi avaliado quanto à motilidade espermática progressiva total, motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático, avaliação de integridade funcional de membrana plasmática e teste de vivos e mortos por coloração supravital por Eosina-Negrosina.

3.3.1. Avaliação Física

As análises dos aspectos físicos do sêmen (motilidade espermática total, motilidade espermática progressiva retilínea e circular e vigor espermático) foram realizadas adicionando 10 µL de sêmen entre lâmina de microscopia e lamínula (24x24mm) pré-aquecidas, a 37°C, em mesa aquecedora e determinadas pela atividade de movimento total, expressas em porcentagens, na avaliação em microscopia óptica, com aumento de 200X. O vigor espermático foi caracterizado pela intensidade de movimento ou de batimento dos espermatozóides, avaliados em microscopia óptica com aumento de 200X, usando-se escala de 1 a 5 pontos (intercaladas a cada 0,5 ponto).

3.3.2. Coloração Supravital (eosina-negrosina)

A avaliação de células vivas e mortas foi realizada pelo teste de coloração utilizando solução de eosina (1%) e negrosina (5%), conforme descrito por Barth & Oko (1989). Nesse sentido, homogenizava-se amostra de 10 µL de sêmen com 10 µL de corante, com auxílio de uma lâmina. Em seguida, confeccionava-se um esfregaço sobre uma lâmina, e após 30 a 40 segundos, analisava-se em microscopia óptica com aumento de 400X, contabilizando o total de células, com e sem núcleos corados de

vermelho, dentro de um grupo de 100 células. As células vivas permaneciam sem se corar e as mortas se coravam, em rosa avermelhado.

3.3.3. Teste Hiposmótico

Amostras de todos os ejaculados foram avaliadas quanto à integridade funcional da membrana plasmática espermática, por meio de teste hiposmótico, seguindo metodologia descrita por Melo (1999). Uma amostra de 100 μ L de sêmen “in natura” foi adicionado a 1000 μ L de solução de sacarose a 100 mOsm/kg, pré-aquecida a 37°C. A solução com o sêmen permanecia incubada a 37°C, por 30 minutos, quando, então, se procedia à fixação das células, adicionando-se 0,5 mL de solução de formol salina tamponada. As avaliações foram realizadas por metodologia de preparação úmida, adicionando-se uma amostra de 10 μ L do sêmen “in natura” entre lâmina e lamínula e secando-se, por sobreposição de papel absorvente. Em seguida, procedia-se à contagem em microscopia óptica com contraste de fase, sob aumento de 1000X. Na análise, todas as células espermáticas apresentando dobra ou enrolamento do flagelo foram consideradas como células reativas ao teste, e todas as células apresentando o flagelo reto foram consideradas não reativas (figura 1).

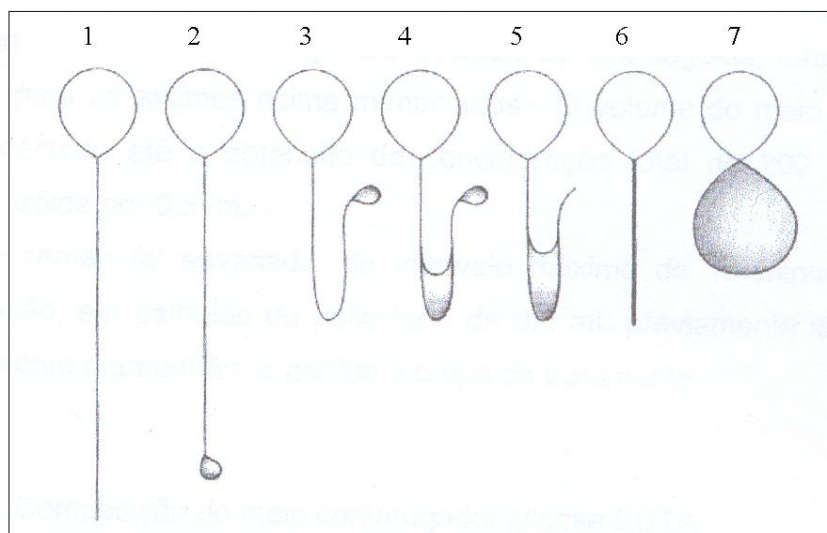


Figura 1: Dobramento de cauda espermática observados na avaliação do teste Hiposmótico: 1 célula não reativa; 2 a 7 células reativas ao teste.

A reação Hiposmótica foi obtida pela equação:

$$\text{HOST} = (\% \text{ de caudas alteradas após o teste HOS-T}) - (\% \text{ de caudas alteradas antes do teste HOS-T}).$$

3.3.4. Morfologia espermática

Amostras dos ejaculados foram coletadas, para avaliação morfológica do sêmen. Nesse sentido, adicionou-se 20 µL de sêmen em 1 mL de solução de formol salina tamponada. Para avaliação, empregou-se o método de preparação úmida. Contabilizavam-se as patologias, segundo a classificação de Blom (1973), preconizadas pelo CBRA (1998), em defeitos maiores, defeitos menores e totais, analisando-os em microscopia óptica com contraste de fase em aumento de 1000X.

3.4. Centrifugação e Preparo pré-resfriamento

Os ejaculados coletados foram imediatamente filtrados com tela de nylon, para separá-los de partículas estranhas e das frações gelatinosas presentes em alguns desses ejaculados. Em seguida, após as avaliações do sêmen “in natura”, o mesmo foi diluído em meio de centrifugação (MaxSêmen Plus[®] – Agrofarma), na proporção de uma parte de sêmen para duas partes de meio diluidor pré-aquecido a 37°C em Banho-Maria, antes de sua adição ao sêmen coletado. As amostras de sêmen coletadas de cada animal foram acondicionadas em volumes iguais, dentro de 3 tubos de centrifugação distintos e identificados (T1, T2 e T3), e centrifugados com a força gravitacional de 600 G, pelo período de 10 minutos, conforme descrito por Dell’Aqua Júnior (2000). Após a centrifugação, com auxílio de pipetas de Pasteur plásticas, o sobrenadante resultante em cada tubo foi aspirado e descartado, deixando apenas o *pelet* precipitado ao fundo de cada tubo.

Em seguida, foi adicionado 1 mL de meio de congelamento com glicerol para o tratamento controle (T1), e 0,95 mL de meio de congelamento sem glicerol para os tratamentos 2 e 3 (T2 e T3). A homogeneização das soluções foi feita com Pipetas de Pasteur, aspirando e preenchendo o volume em movimentos suaves sobre o *pelet* ao fundo dos tubos.

3.5. Tratamentos

O tratamento controle (T1) baseou-se na adição de meio de congelamento com glicerol (tabela 2), antes do início do resfriamento (em temperatura ambiente). Os tratamentos 2 e 3 (T2 e T3) basearam-se na adição de meio de congelamento sem glicerol (tabela 3), antes do início do resfriamento.

No tratamento 2 (T2), o glicerol foi adicionado com 35 minutos de resfriamento (quando a amostra de sêmen apresentava temperatura de 8° C), no momento da retirada dos tubos do recipiente com álcool absoluto. No tratamento 3 (T3), o glicerol foi adicionado com 60 minutos (quando o sêmen apresentava temperatura de 4°C), imediatamente antes do envase e congelamento do sêmen. Em ambos os tratamentos, o volume total de glicerol foi correspondente a 5% do volume total de diluidor acrescentado antes do resfriamento.

3.6. Concentração espermática

A concentração de espermatozóides foi determinada após a centrifugação e ressuspensão do *pelet*. O procedimento foi realizado por meio de câmara de Neubauer espelhada. Uma amostra de 10 µL de sêmen de cada tratamento (T1, T2 e T3) foi adicionada em 1000 µL de solução de formol salina tamponada, em recipientes distintos e identificados para cada tratamento. Em seguida, a câmara de Neubauer foi preenchida com a solução de sêmen e avaliada em microscopia óptica, a um aumento de 400X.

A concentração espermática foi calculada para 400×10^6 espermatozóides por mL, acrescentando diluidor de criopreservação. Nos tratamentos 2 e 3, adicionava-se 5% a menos do volume total calculado, que correspondia ao total de glicerol a ser acrescentado nas etapas posteriores.

3.7. Resfriamento

O resfriamento do sêmen foi realizado segundo metodologia descrita por Fürst et al. (2003). Os tubos, contendo as amostras de sêmen dos três tratamentos, foram acondicionados no interior de um refil plástico, que se projetava no interior de

um recipiente cilíndrico de 240 mL, contendo 120 mL de álcool absoluto. O recipiente foi posicionado, horizontalmente, no interior de uma câmara fria (refrigerador), com temperatura interna de 4 a 5°C, por 35 minutos, sendo que a temperatura do sêmen era de 8°C. Posteriormente, os tubos foram retirados dos respectivos recipientes, porém permaneceram no refrigerador por mais 25 minutos, sendo que a temperatura do sêmen era de 4°C.

O volume de glicerol, que foi acrescentado durante o resfriamento nos tubos T2 e T3, foi acondicionado na câmara fria, junto com palhetas de envase, para impedir oscilações de temperatura durante a adição do glicerol ao sêmen diluído e durante o envase do sêmen.

3.8. Envase

Após o tempo de resfriamento de cada tratamento, o sêmen foi envasado em palhetas francesas (IMV[®]) de 0,5 mL, previamente refrigeradas a 4°C. Esse procedimento também ocorreu no interior da mesma câmara fria de resfriamento, para evitar possíveis oscilações de temperatura.

O envase consistiu na aspiração do sêmen para o interior das palhetas que, imediatamente, foram seladas na extremidade pelo álcool polivinílico, presente na mesma e, na outra extremidade, por massa moldável atóxica.

3.9. Congelamento

O congelamento do sêmen foi realizado em uma caixa isotérmica (de 20 cm de altura, 60 cm de comprimento e 30 cm de largura), contendo 6 cm de Nitrogênio líquido. As palhetas, já envasadas, foram acondicionadas lado a lado, na posição horizontal, sobre uma plataforma (grade). Essa estrutura proporcionou uma distância de 4 cm livres entre a lâmina do Nitrogênio líquido e as palhetas. Após 20 minutos nessa posição, as mesmas foram submersas em Nitrogênio líquido.

As palhetas congeladas foram raqueadas dentro da caixa isotérmica e acondicionadas em canisteres, no interior de um botijão de Nitrogênio líquido, onde permaneceram armazenadas a -196° C, por um período mínimo de 12 dias.

3.10. Descongelamento

As palhetas foram descongeladas, para análise de aspecto físico (motilidade e vigor espermático) e testes complementares (Morfológico, Hiposmótico, Coloração Supravital e Teste de Termorresistência). O descongelamento das palhetas foi realizado em banho-maria a 75°C, por 7 segundos, e incubados a 37°C, de acordo com a metodologia descrita por Cristanelli et al. (1984).

3.11. Avaliação do sêmen congelado e descongelado

3.11.1. Avaliação Física

Foram realizadas avaliações físicas do sêmen congelado e descongelado, para mensurações de motilidade espermática total, motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático.

Para a realização desses exames, uma amostra de 10 µL de sêmen foi depositada entre lâmina e lamínula de microscopia pré-aquecida a 37°C, em mesa aquecedora, e avaliadas em microscópio óptico, a um aumento de 100X ou 200X, conforme descrito para o sêmen “in natura” (item 3.4.1).

3.11.2. Morfologia

Para avaliação morfológica do sêmen congelado e descongelado, utilizou-se a mesma metodologia descrita para o sêmen “in natura” (item 3.4.4.)

3.11.3 Hiposmótico

Para realização da avaliação de teste Hiposmótico do sêmen congelado e descongelado, adotou-se a metodologia descrita por Alves et al. (2005). Uma amostra de 50 µL do sêmen congelado e descongelado foi depositada em um recipiente plástico de 1,5 mL (“ependorf”), contendo 500 µL de água destilada, pré-aquecida a 37° C, e incubada por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a fixação das células, com adição de 0,5 mL de formol salina tamponada.

As amostras dos conjuntos fixados foram avaliadas conforme descrito para o sêmen “in natura” (item 3.4.3.).

3.11.4. Coloração Supravital

As colorações supravitais foram realizadas com sêmen congelado e descongelado, de acordo com a metodologia descrita para o sêmen “in natura” (item 3.4.2.).

3.11.5. Teste de Termoresistência (TTR)

As amostras das palhetas do sêmen congelado e descongelado foram depositadas em recipientes plásticos de 1,5 mL (“ependorf”) e incubadas a 37°C, em Banho-Maria. Avaliações quanto ao aspecto físico do sêmen (motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático) foram realizadas antes da incubação (tempo 0) e após 30, 60, 90 e 120 minutos, de acordo com a metodologia descrita por Zúccari, 1998.

3.12. Meios de diluição

Para os procedimentos de centrifugação, foi utilizado meio de resfriamento à base de leite em pó (MaxSêmen Plus[®] – Agrofarma).

Os diluidores para criopreservação do sêmen foram manipulados no Laboratório de Reprodução Animal (Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Viçosa).

Inicialmente, foi feita solução de glicose-EDTA (tabela 1), que também foi utilizada na composição do diluidor de criopreservação, proposto por Martin et al. (1979).

Tabela 1: Composição de solução de glicose-EDTA utilizado para o congelamento do sêmen dos garanhões.

Reagentes	Quantidade
D (+) glicose monohidratada	6,000 g
Citrato de Sódio	0,375 g
EDTA (Etileno diaminotetracefatodissódico)	0,370 g
Bicarbonato de sódio	0,125 g
Sulfato de gentamicina	80 mg
PH	6,59
mOsm/L	409
H ₂ O bidestilada qsp	100 mL

Os diluidores de congelamento foram manipulados em seguida, conforme sumariado na tabela 2. Para a execução dos tratamentos, também foram manipulados diluidores de congelamento que não continham glicerol na composição.

Tabela 2: Composição do meio utilizado para o congelamento do sêmen de garanhões.

Reagentes	Quantidade
Solução de Lactose a 11%	50,0 mL
Meio de centrifugação (tabela 1)	25,0 mL
Gema de ovo	20,0 mL
Equex STM	0,8 mL
Glicerol	5,0 mL
VOLUME TOTAL	100,8 mL

Para o teste Hiposmótico do sêmen “in natura”, foi preparada solução de sacarose a 100 mOsm/kg, segundo metodologia descrita por Melo (1999), estando sumariadas nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Composição de meio Hiposmótico à base de sacarose 300 mOsm/kg.

Reagentes	Quantidade
Sacarose	10,27 g
H ₂ O bidestilada qsp	100 mL

Tabela 4: Composição de meio Hiposmótico à base de sacarose 100 mOsm/kg.

Reagentes	Quantidade
Solução sacarose 300 mOsm/Kg	100 mL
H ₂ O bidestilada qsp	200 mL

3.13. Análise Estatística

Foi utilizado o programa estatístico SAEG 9.1 (UFV – 1997). Para todas as variáveis, foi realizada a estatística descritiva (média e desvio padrão). Para todas as variáveis quantitativas, foram realizados os testes de Lilliefors e Bartlett, para verificar a normalidade dos dados e homogeneidade da variância por tratamento, respectivamente. Para a característica de vigor, foi realizada análise não paramétrica com comparação de médias, pelo teste de Kuskal Wallis.

Os dados quantitativos foram analisados por ANOVA, verificando o efeito de ganhões e diluidores, e, quando houve significância, pelo teste “F”, foram comparadas as médias, pelo teste de Tukey, com 5 % de probabilidade de erro.

Para a característica de motilidade espermática total, no teste de termoresistência, foi realizada análise de regressão, para verificar o comportamento da mesma em função do tempo de incubação, e para estimar a melhor equação para o comportamento.

Foi efetuada análise de correlação simples de Pearson, para verificar a relação entre os dados estudados, tanto para o sêmen “in natura”, quanto para o pré e pós descongelados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros espermáticos, registrados para o sêmen “in natura” de ambos os garanhões utilizados no experimento, estão sumariados nas tabelas 5 e 6. Os parâmetros físicos dos ejaculados analisados (motilidade espermática total, motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático) foram contrastados entre os indivíduos. No entanto, não diferiram entre si ($P > 0,05$). Ambos os garanhões apresentaram motilidade espermática total próxima ao limiar mínimo exigido pelo CBRA (1998) (motilidade espermática total de 70%). Observações semelhantes foram verificadas para o vigor espermático, principalmente no sêmen do garanhão 1 ($2,9 \pm 0,2$), que se encontrava em regime de acasalamento, na ocasião do início do experimento. No entanto, apesar da qualidade física do sêmen observada, utilizaram-se os dois garanhões, devido aos históricos de fertilidade apresentado por ambos.

Tabela 5: Valores médios e desvios padrão* de Motilidade espermática Total (MotTot), Motilidade espermática Progressiva Retilínea (MotRet) e vigor espermático de dois garanhões adultos da raça Mangalarga Marchador.

<i>Anim</i>	<i>MotTot (%)</i>	<i>MotRet (%)</i>	<i>Vigor</i>
1	$67,5 \pm 6,1$	$38,3 \pm 2,6$	$2,9 \pm 0,2$
2	$70,0 \pm 5,0$	$46,01 \pm 8,5$	$3,1 \pm 0,2$
Méd	$68,6 \pm 5,5$	$41,81 \pm 7,2$	$3,0 \pm 0,2$
CV	8,2	15,0	7,1

Anim = animal; Méd = média; CV = coeficiente de variação.

* $P > 0,05$ pelo ANOVA e teste de Tukey com 5 % de probabilidade de erro.

A qualidade espermática dos ejaculados dos animais foi avaliada em testes complementares. Optou-se por não acrescentar o teste de termorresistência, na avaliação do sêmen “in natura”, por se entender que não se tratava do objetivo deste estudo avaliar a longevidade do sêmen “in natura” e sim do sêmen congelado e descongelado. Nesse sentido, complementou-se a avaliação física das amostras de sêmen, por teste de integridade e funcionalidade de membrana plasmática (teste de Hiposmótico - HOST e Teste de coloração Supravital por Eosina-Negrosina – SV, respectivamente). Adicionalmente, foram realizadas avaliações morfológicas do sêmen, por se tratar de um potencial parâmetro relacionado à fertilidade (Jasko, 1990).

Os valores médios obtidos nos testes complementares e de morfologia espermática do sêmen “in natura” estão sumariados na tabela 6. Quanto às avaliações de integridade de membrana (Hiposmótico e Supravital), não foram registradas diferenças entre os animais. Da mesma forma, não foram registradas correlações ($P > 0,05$) entre o teste hiposmóticos e colorações supravitalis nas avaliações do sêmen “in natura” (tabela 7). Tais observações não corroboram Melo (1999), que registrou correlação de até 70 % entre os mesmos testes. Adicionalmente, a autora descreveu correlações de até 68 % entre os testes hiposmóticos (utilizando a mesma solução de preparo no presente estudo) e as características físicas do sêmen “in natura”. O mesmo foi observado entre as características físicas e a coloração supravital (até 75%). No entanto, a avaliação da autora se restringiu ao sêmen equino resfriado, já devidamente diluído com diluidores à base de leite desnatado ou gema de ovo, que pode ter contribuído para as diferenças observadas, com relação ao presente estudo, onde o sêmen foi avaliado sem nenhuma diluição prévia, ou seja, “in natura”.

Tabela 6: Valores médios e desvios padrão* das análises morfológicas e de integridade de membrana espermática do sêmen “in natura” de dois garanhões da raça Mangalarga Marchador.

<i>Anim</i>	<i>Host (%)</i>	<i>SV (%)</i>	<i>DefMe (%)</i>	<i>DefMa (%)</i>	<i>DefTot (%)</i>
1	53,1 ± 8,4 ^A	70,5 ± 5,5 ^A	4,2 ± 2,7 ^A	25,21 ± 4,2 ^A	29,4 ± 4,6 ^A
2	52,9 ± 3,2 ^A	69,4 ± 7,5 ^A	6,81 ± 1,4 ^A	34,1 ± 4,3 ^B	40,91 ± 4,7 ^B
Méd	53,0 ± 6,3	70,01 ± 6,1	5,41 ± 2,6	29,3 ± 6,1	34,61 ± 7,4
CV	11,9	9,2	42,2	14,5	13,4

Anim = Animal; Host = teste hiposmótico; SV = coloração supravital por eosina-negrosina; DefMe = defeitos espermáticos menores; DefMa = defeitos espermáticos maiores; DefTot = defeitos espermáticos totais. Méd = média; CV = Coeficiente de Variação.

*A e B ANOVA e teste de Tukey, $p < 0,05$.

Houve diferença entre os animais com relação aos aspectos morfológicos do sêmen ($P < 0,05$). Segundo parâmetros de desclassificação preconizados pelo CBRA (1998), o garanhão 2 não estaria apto ao congelamento de sêmen, por apresentar incidência de patologia espermática superior a 30%. No entanto, as patologias espermáticas não foram consideradas desclassificadoras para a realização desse estudo, em função da pouca disponibilidade de garanhões para compor o grupo experimental.

Na tabela 7, estão sumariadas as correlações entre os parâmetros físicos, parâmetros de integridade de membrana (hiposmótico e supravital) e morfológico do sêmen “in natura”. Não houve correlação ($P > 0,05$) nas avaliações registradas entre

a motilidade espermática do sêmen (total e progressiva retilínea) e os testes de integridade de membrana. No entanto, registrou-se correlação alta e positiva ($P < 0,05$) entre vigor espermático e a coloração supravital, indicando que o teste de coloração supravital não permite a leitura completa dos parâmetros físicos desse tipo de sêmen, uma vez que a mesma correlação não foi observada quanto às características de motilidade total e motilidade progressiva retilínea.

Tabela 7: Correlações simples de Pearson entre os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen “in natura” de dois garanhões da raça Mangalarga Marchador.

	<i>MotTot</i>	<i>MotRet</i>	<i>Vigor</i>	<i>Host</i>	<i>SV</i>	<i>DefMe</i>	<i>DefMa</i>	<i>DefTot</i>
<i>MotTot</i>	1	0,57	NS*	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MotRet</i>		1	0,62	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Vigor</i>			1	NS	0,73	0,61	NS	NS
<i>Host</i>				1	NS	NS	NS	NS
<i>SV</i>					1	NS	NS	NS
<i>DefMe</i>						1	NS	0,64
<i>DefMa</i>							1	0,95
<i>DefTot</i>								1

MotTot = motilidade espermática total; MotRet = motilidade espermática progressiva retilínea; Host = teste hiposmótico; SV = coloração supravital por eosina-negrosina; DefMe = defeitos espermáticos menores; DefMa = defeitos espermáticos maiores; DefTot = defeitos espermáticos totais.

NS* = não significativo. $P > 0,05$.

Os valores obtidos no teste hiposmótico não apresentaram correlação ($P > 0,05$) com os valores obtidos no teste de coloração supravital. Por outro lado, ao avaliar os valores médios de motilidade espermática progressiva total, pode-se afirmar que a metodologia do teste hiposmótico propiciou alta incidência de espermatozóides reativos na avaliação do sêmen equino “in natura”, devido à proximidade dos valores apresentados entre ambos os parâmetros (tabelas 5 e 6). Adicionalmente, a ausência de correlação, no presente estudo, está relacionada com a metodologia experimental proposta, visto que, nas avaliações de Melo (1999), o sêmen analisado foi diluído e resfriado.

Não se verificou diferenças ($P > 0,05$) quanto aos parâmetros físicos (motilidade progressiva total e vigor espermático) no sêmen pré-resfriado, diluído em meio contendo glicerol (tratamento 1 – controle) e em meios que não continham glicerol (tratamento 2 e tratamento 3) (tabela 8). Com os dados obtidos, verificou-se que a presença do glicerol e o possível choque osmótico provocado pelo mesmo (Hammersted & Graham, 1992) não foram evidenciados nesse estudo, ao se analisar a qualidade física do mesmo sêmen, imediatamente a adição dos diluidores.

Tabela 8: Valores médios e desvios padrão* de motilidade espermática total (MotTot) e vigor espermático (vigor) do sêmen equino diluído pré-resfriamento, submetido a diferentes protocolos de diluição.

<i>Trat</i>	<i>MotTot (%)</i>	<i>Vigor</i>
1	69,1 ± 6,3	3,1 ± 0,3
2	67,3 ± 5,6	3,1 ± 0,2
3	65,9 ± 8,0	3,0 ± 0,4
Méd	67,4 ± 6,6	3,1 ± 0,3
CV	9,9	10,4

Tratamento 1 = controle com adição do glicerol antes do resfriamento. Tratamento 2 e 3 = adição do glicerol com 35 e 60 minutos de resfriamento, respectivamente.

* P > 0,05 por ANOVA e teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

Os valores médios obtidos nas avaliações físicas, nos testes de integridade de membrana, realizados no sêmen, imediatamente após o descongelamento, estão sumariados na tabela 9.

Tabela 9: Valores médios e desvios padrão* de motilidade espermática total (MotTot), motilidade espermática progressiva retilínea (MotRet), vigor espermático (vigor), Teste Hiposmótico (Host) e supravital (SV) do sêmen equino congelado e descongelado, de acordo com os tratamentos (trat)

<i>Trat</i>	<i>MotTot (%)</i>	<i>MotRet (%)</i>	<i>Vigor</i>	<i>Host (%)</i>	<i>SV (%)</i>
1	30,0 ± 6,7	25,9 ± 6,3	2,6 ± 0,5	29,3 ± 13,6	35,7 ± 7,4
2	30,0 ± 13,0	26,0 ± 11,9	2,5 ± 0,6	24,8 ± 9,4	37,1 ± 14,6
3	30,5 ± 11,1	26,2 ± 9,8	2,6 ± 0,6	19,0 ± 6,0	41,2 ± 12,0
Méd	30,2 ± 10,3	26,0 ± 9,3	2,6 ± 0,5	24,3 ± 6,0	38,0 ± 11,6
CV	35,2	36,9	21,4	24,6	30,9

Méd = média; CV = coeficiente de variação; Tratamento 1 = controle com adição do glicerol antes do resfriamento. Tratamento 2 e 3 = adição do glicerol com 35 e 60 minutos de resfriamento, respectivamente.

* P > 0,05 por ANOVA e teste de Tukey com 5 % de probabilidade de erro.

Os valores de motilidade espermática total e retilínea mostram-se dentro dos padrões preconizados pelo CBRA (1998), para o sêmen congelado e descongelado, independente do tratamento analisado (motilidade total mínima = 30%). Isso sugere que o glicerol preservou, de maneira satisfatória, a motilidade espermática após o processo de criopreservação. No entanto, os valores de vigor permaneceram, em média (2,6 ± 0,5), ligeiramente inferiores ao recomendado pela referida entidade (vigor mínimo = 3).

Não foram observadas diferenças, para os parâmetros físicos, entre os valores médios de cada tratamento (P > 0,05). Esses resultados demonstram que o intervalo

de exposição ao glicerol e o tempo de equilíbrio com o sêmen antes do congelamento, não interfere na qualidade seminal, quanto à motilidade espermática total, progressiva retilínea e vigor espermático. Adicionalmente, ao avaliar os resultados dos testes Hiposmótico e Supravital, percebe-se que a presença do glicerol interfere na integridade de membrana plasmática de maneira semelhante ($P > 0,05$), independente do tempo que o mesmo leva para atuar na célula (equilíbrio), sugerindo que a curva de resfriamento utilizada no processo de congelamento (Fürst et al., 2003) parece exercer maior influência no sucesso da criopreservação espermática, que o tempo de equilíbrio ou tempo de exposição do crioprotetor ao sêmen.

Tais observações corroboram os relatos de Nishkawa et al. (1975), que relataram que a ausência do tempo de equilíbrio com o glicerol não interfere na qualidade seminal do sêmen congelado e descongelado, ao comparar o procedimento com protocolos que utilizavam tempo de equilíbrio de 1 hora, antes do congelamento. Vidament et al. (2000) relataram que a adição do glicerol no sêmen a 4°C, imediatamente antes do congelamento, não incrementa a qualidade espermática nas avaliações pós-descongelamento, sendo que essas conclusões corroboram as do presente estudo, que verificou que o tempo de equilíbrio não apresentou efeito benéfico sobre a congelabilidade espermática. Adicionalmente, Guay & Rondeau (1981) relataram que a adição fracionada do glicerol, durante o processo de resfriamento do sêmen de garanhões, preserva, de maneira adequada, o sêmen, quando realizadas as avaliações pós-descongelamento.

No entanto, os estudos relacionados à adição de crioprotetores de células espermáticas, em diferentes etapas do resfriamento do sêmen, apresentam resultados contraditórios, quando analisados em outras espécies, ou mesmo com outros agentes crioprotetores. Mello et al. (2005) concluíram que a adição fracionada de dimetilformamida ao sêmen equino melhora os parâmetros de motilidade espermática progressiva e de integridade de membrana, não corroborando os resultados deste estudo.

Os registros de Silva et al (2006) corroboram as conclusões do presente estudo. Os autores não observaram diferenças na congelabilidade do sêmen canino, quando compararam a adição do glicerol, durante diferentes etapas do resfriamento, antes do congelamento do mesmo. A adição do crioprotetor foi realizada quando o sêmen apresentava temperatura de 22° C ou de 4° C.

No presente estudo, a diferença entre o percentual de motilidade espermática total e motilidade espermática progressiva retilínea foi menor, após o congelamento do sêmen. Sugere-se com isso que as células espermáticas com motilidade curvilínea são mais sensíveis à criopreservação, e que o procedimento seleciona as células espermáticas com motilidade retilínea.

Na tabela 10, estão sumariados os valores de correlação simples de Pearson entre características físicas do sêmen equino pré-resfriamento, os testes Hiposmótico e supravital, independente dos protocolos de congelamento. Observa-se correlação positiva ($P < 0,05$) entre os parâmetros físicos, dentro do sêmen congelado e descongelado e dentro do sêmen pré-resfriado, mas não entre os parâmetros físicos dos dois tipos de sêmen ($P > 0,05$). Os valores obtidos nos testes Hiposmóticos do sêmen congelado e descongelado não apresentaram correlações ($P > 0,05$) com os parâmetros físicos de ambos os tipos de sêmen, com exceção do vigor espermático do sêmen pré-resfriado, que apresentou valores de correlação considerados médios ($r = 0,37$).

Tabela 10: Correlações simples de Pearson entre características físicas do sêmen equino diluído pré-resfriamento, com características físicas, teste Hiposmótico e supravital do sêmen pós descongelamento.

	<i>MotTotD</i>	<i>MotRetD</i>	<i>VigorD</i>	<i>MotPré</i>	<i>VigPré</i>	<i>HostD</i>	<i>SVD</i>
<i>Mot TotD</i>	1	0,96	0,80	NS*	NS	NS	0,81
<i>MotRetD</i>		1	0,79	NS	NS	NS	0,81
<i>VigorD</i>			1	NS	NS	NS	0,64
<i>Mot Pré</i>				1	0,37	NS	NS
<i>Vig Pré</i>					1	NS	NS
<i>HostD</i>						1	NS
<i>SVD</i>							1

MotTotD = motilidade total do sêmen congelado e descongelado; *MotRetD* = motilidade retilínea do sêmen congelado e descongelado; *VigorD* = vigor do sêmen congelado e descongelado; *MotPré* = motilidade total do sêmen pré-resfriamento; *VigorPré* = vigor do sêmen pré-resfriamento; *HostD* = teste hiposmótico do sêmen congelado e descongelado; *SVD* = coloração supravital por eosina-negrosina do sêmen congelado e descongelado.

NS* = não significativo. $P > 0,05$.

Por outro lado, o teste supravital utilizado para o sêmen congelado e descongelado apresentou correlação alta ($P < 0,05$) com os parâmetros físicos do sêmen congelado e descongelado. No entanto, Guay & Rondeau (1981) não recomendaram a associação desses corantes para esse tipo de avaliação, e sim a utilização apenas de eosina em concentrações superiores a 5 %, devido à alteração na permeabilidade de membrana, induzida pelo processo de criopreservação.

Adicionalmente, a utilização de eosina e negrosina para o procedimento de coloração supravital pode não apresentar correlação com a real integridade da célula, por corar apenas uma região da cabeça do espermatozóide, não permitindo a avaliação da integridade da cauda. Vale ressaltar que a concentração dos corantes, descritas por Barth & Oko (1989), foram utilizadas primariamente para avaliação do sêmen bovino, mas apresentou-se bastante satisfatória para a avaliação da integridade de membrana dos espermatozoides criopreservados no presente estudo.

Na tabela 11, estão sumariados os valores de correlação entre as características físicas pra o sêmen “in natura” e “congelado e descongelado” para os 3 diferentes protocolos de congelamento (T1, T2 e T3). Observou-se correlação entre os parâmetros físicos do sêmen, dentro dos três tratamentos propostos ($P < 0,05$).

Tabela 11: Correlações simples de Pearson entre parâmetros espermáticos do sêmen “in natura” (IN) e congelado e descongelado (D) de garanhões criados em regime semi-intensivo.

	<i>MotD</i>	<i>VigD</i>	<i>SVD</i>	<i>HostD</i>	<i>MotIN</i>	<i>VigIN</i>	<i>SVIN</i>	<i>HostIN</i>
<i>Tratamento 1</i>								
<i>MotD</i>	1	0,66	NS*	0,54	NS	NS	NS	NS
<i>VigD</i>		1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>SVD</i>			1	NS	NS	NS	NS	NS
<i>HostD</i>				1	NS	NS	NS	NS
<i>Tratamento 2</i>								
<i>MotD</i>	1	0,94	NS	0,85	NS	NS	NS	NS
<i>VigD</i>		1	NS	0,78	NS	NS	NS	NS
<i>SVD</i>			1	NS	NS	0,54	0,52	NS
<i>HostD</i>				1	NS	NS	NS	NS
<i>Tratamento 3</i>								
<i>MotD</i>	1	0,69	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>VigD</i>		1	0,63	NS	NS	NS	NS	NS
<i>SVD</i>			1	NS	NS	NS	NS	NS
<i>HostD</i>				1	NS	NS	NS	NS

MotD = motilidade espermático total do sêmen congelado e descongelado; *VigD* = vigor espermático do sêmen congelado e descongelado; *SVD* = coloração supravital por eosina-negrosina do sêmen congelado e descongelado; *HostD* = teste hiposmótico do sêmen congelado e descongelado; *MotIN* = motilidade espermático total do sêmen “in natura”; *VigIN* = vigor espermático do sêmen “in natura”; *SVIN* = coloração supravital por eosina-negrosina do sêmen “in natura”; *HostIN* = teste hiposmótico do sêmen “in natura”.

NS* = não significativo. $P > 0,05$.

Correlações entre o teste Hiposmótico, utilizado para o sêmen congelado e descongelado, e o parâmetro físico de motilidade espermática total do mesmo sêmen foram observadas em todos os tratamentos utilizados ($P < 0,05$), com exceção do vigor espermático, analisado no tratamento 1 ($P > 0,05$) (tabela 11). Estes dados estão de acordo com a literatura consultada, sendo que correlações entre os mesmos

parâmetros do sêmen congelado foram descritas por Neild, et al. (1999) e Alves et al. (2005).

A coloração supravital do sêmen congelado e descongelado não apresentou correlação com os parâmetros físicos analisados ($P > 0,05$), com exceção do vigor espermático das amostras descongeladas no tratamento 3. Com relação aos testes Hiposmóticos realizados nos protocolos de criopreservação (T1, T2 e T3), verificou-se correlação apenas entre os testes de integridade de membrana do sêmen “in natura” com a coloração supravital do sêmen congelado e descongelado, no tratamento 2 ($P < 0,05$), não havendo correlação com as demais características estudadas no sêmen congelado e descongelado ($P > 0,05$).

As diferenças de correlações entre os parâmetros do sêmen congelado e descongelado, observadas quando os valores sumariados nas tabelas 10 e 11 são confrontados, devem-se a avaliação por tratamento, onde o “n” amostral é reduzido. Isso modifica o grau de significância do coeficiente de correlação, mas não o valor do coeficiente em si. Por outro lado, a ausência de correlações entre muitos parâmetros analisados no presente estudo, mostra que os testes complementares utilizados possuem grande importância na avaliação espermática, uma vez que os mesmos possibilitam o conhecimento das alterações que ocorrem durante o procedimento de criopreservação, que não são evidenciados pelas avaliações convencionais de motilidade e vigor espermático.

As avaliações dos aspectos físicos do sêmen por muito tempo estiveram diretamente ligadas à capacidade fecundante da célula espermática. Porém sempre foram caracterizadas pelo grau elevado de subjetividade de leitura, ou mesmo, pela inviabilidade econômica, quando analisadas em equipamentos computadorizados. Assim, as avaliações dos testes *in vitro* nem sempre presumem a real capacidade que a célula espermática tem de fertilizar um ovócito no trato reprodutivo feminino. Essas conclusões foram relatadas por Snoeck et al. (2003), que propuseram que o efeito tóxico do glicerol poderia estar relacionado a alterações na capacidade fecundante da célula, e não aos parâmetros analisados *in vitro*. Assim, sugere-se que os testes de fertilidade sejam os melhores indicadores da viabilidade do sêmen congelado e descongelado, e que os parâmetros ideais de leitura do sêmen *in vitro*, devem ser correlacionados com o mesmo, e não com os demais parâmetros de avaliação, por assim perderem o caráter de complementariedade entre si. Porém, no presente estudo, os testes de fertilidade não foram realizados.

Nesse sentido, Jasko (1990) propuseram que as análises da morfologia espermática poderiam substituir as triagens de fertilidade, devido ao fato de terem registrado correlação positiva entre o percentual de células espermáticas morfolologicamente normais e índices de gestação.

Porém, os dados sumariados na tabela 12 demonstram que, no presente estudo, não houve diferenças nos valores dos diferentes tratamentos, no que se refere a percentual de defeitos espermáticos maiores, defeitos espermáticos menores e defeitos espermáticos totais no sêmen congelado e descongelado, sugerindo que, possivelmente, não haja diferenças entre o sêmen submetido a cada tratamento, quanto à capacidade fecundante. Por outro lado, os valores de morfologia encontrados para o sêmen congelado e descongelado demonstram que o processo de criopreservação aumenta a quantidade de patologias espermáticas no sêmen equino (tabela 13).

Tabela 12: Valores médios e desvios padrão * dos defeitos de patologia espermática do sêmen equino congelado e descongelado, de acordo com diferentes protocolos de congelamento.

<i>Trat</i>	<i>DefMa</i>	<i>DefMe</i>	<i>DefTot</i>
1	35,5 ± 12,0	4,6 ± 2,5	40,1 ± 11,5
2	33,7 ± 7,9	5,95 ± 2,8	39,6 ± 8,2
3	36,1 ± 8,9	8,2 ± 4,6	44,3 ± 7,7
Méd	35,1 ± 9,5	6,3 ± 3,6	41,4 ± 9,2
CV	27,8	54,7	22,4

DefMe = defeitos espermáticos menores; DefMa = defeitos espermáticos maiores; DefTot = defeitos espermáticos totais; Trat = tratamento; Méd = média; CV = Coeficiente de Variação

* (P < 0,05) ANOVA e teste de Tukey de 5 % de probabilidade erro

As relações registradas entre o teste supravital e o percentual de defeitos espermáticos maiores, e defeitos espermáticos totais são consideradas médias ($r = 0,49$, e $0,36$, respectivamente, $P < 0,05$). A correlação entre defeitos espermáticos menores e o mesmo teste é negativa ($r = -0,37$, $P < 0,05$), não sendo encontradas, no presente estudo, explicações biológicas para esse fato, uma vez que o teste supravital indicaria o percentual de células vivas (normais). Apesar disso, ressalta-se que Jasko (1990) relataram que os defeitos espermáticos possuem alta correlação com fertilidade. Os registros do presente estudo indicam que a coloração supravital foi o teste que mais se aproximou das avaliações morfológicas do sêmen, o que sugere relação desse teste com fertilidade, com base nos relatos desses autores.

Os valores de motilidade espermática total e vigor espermático de acordo com os tempos no teste de termoresistência estão sumariados na tabela 13. Não foram registradas diferenças entre os valores médios dos diferentes tratamentos ($P > 0,05$), havendo, para todos os tratamentos, comportamentos similares (comportamento quadrático em função do tempo).

Tabela 13: Valores médios e desvios padrão* da motilidade espermática total (Mot) e do vigor espermático (vig) do sêmen eqüino congelado e descongelado, ao longo do tempo do teste de termoresistência.

T	<i>Teste de Termoresistência (minutos)</i>									
	0		30		60		90		120	
	Mot	Vig	Mot	Vig	Mot	Vig	Mot	Vig	Mot	Vig
1	30,0 ± 6,7	2,6 ± 0,5	19,4 ± 9,4	2,0 ± 0,3	10,8 ± 5,5	1,7 ± 0,4	5,8 ± 3,7	1,3 ± 0,4	2,3 ± 3,0	0,8 ± 0,5
2	30,0 ± 3,0	2,5 ± 0,6	15,9 ± 9,2	2,0 ± 0,7	10,5 ± 6,5	1,6 ± 0,5	7,4 ± 5,4	1,2 ± 0,3	4,4 ± 3,3	1,1 ± 0,5
3	30,5 ± 11,1	2,6 ± 0,6	14,1 ± 7,7	2,1 ± 0,2	11,4 ± 7,4	1,6 ± 0,4	6,4 ± 4,9	1,3 ± 0,4	3,7 ± 2,8	1,1 ± 0,2
x	30,2 ± 10,3	2,6 ± 0,5	16,5 ± 8,8	2,0 ± 0,5	10,91 ± 6,3	1,7 ± 0,4	6,5 ± 4,6	1,3 ± 0,4	3,5 ± 3,1	1,0 ± 0,4

* ($P > 0,05$) ANOVA e teste de Tukey com 5 % de probabilidade erro.

Os valores registrados no presente estudo sugerem que o tempo de equilíbrio com o glicerol não incrementa a longevidade das células espermáticas, não corroborando as conclusões de Ohata et al. (2005), que concluíram que o tempo de equilíbrio com o glicerol é importante, por manter a integridade acrossomal da célula espermática e por aumentar sua longevidade.

É interessante notar que as médias de motilidade espermática e vigor espermáticos apresentaram resultados desfavoráveis quanto à fertilidade, a partir de 30 minutos, de acordo com os valores preconizados pelo CBRA (1998) (motilidade espermática total menor que 20%, e vigor espermático menor que 2). Esses resultados corroboram parcialmente os argumentos de Zúccari (1998), que concluiu que a avaliação de longevidade espermática de sêmen de garanhões deve ser reduzida em relação a outras espécies, uma vez que dificilmente apresentará mais de 10 % de motilidade espermática e vigor espermático 2, com mais de 120 minutos de incubação, no teste de termo resistência. Para a autora, apesar da pouca motilidade espermática, o vigor espermático com escore 2 ainda apresenta relações com a fertilidade. No entanto, os dados na tabela 13

e a figura 2 demonstram que, com 90 minutos de incubação no teste de termoresistência, poucas foram as avaliações com mais de 10 % de população espermática viva, e nenhuma com escore maior que 2. Isso sugere que as amostras de sêmen congelado e descongelado obtidas nesse estudo não são aptas à fertilização, ao

se avaliar a longevidade das mesmas, por meio do teste de termoresistência, proposto pela autora supracitada.

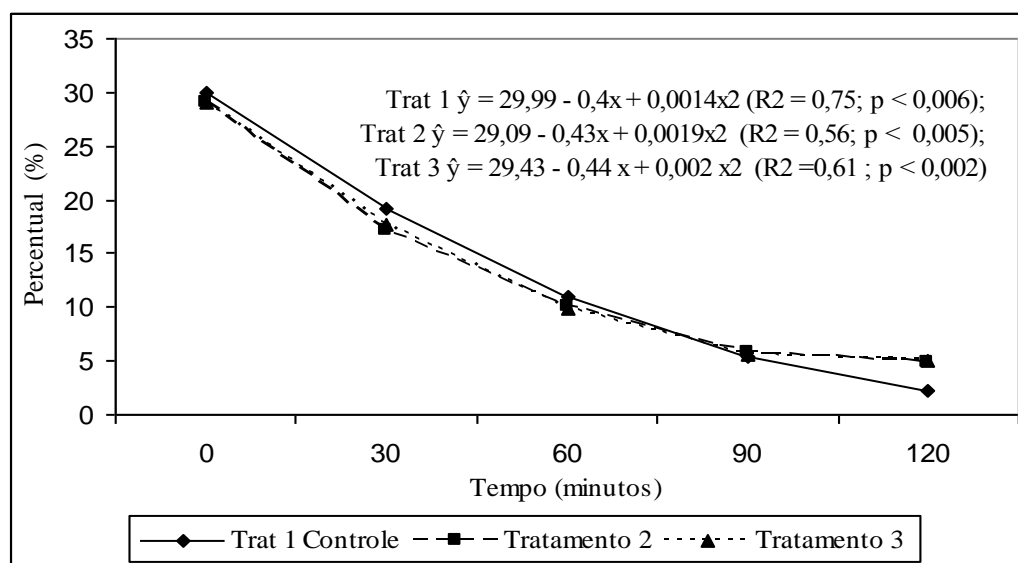


Figura 2: Motilidade espermática total de sêmen equino congelado e descongelado, em três diferentes protocolos de congelamento em função do tempo de teste de termoresistência.

5. CONCLUSÕES

O tempo de equilíbrio do glicerol com o sêmen eqüino não contribui para melhoria na qualidade do processo de criopreservação na espécie eqüina, quanto à motilidade espermática total, motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático e aspectos morfo-estruturais e funcionais da membrana plasmática.

Os parâmetros físicos e de integridade de membrana do sêmen “in natura” e pós-centrifugado apresentam pouca capacidade de predizer a qualidade dos parâmetros físicos e de integridade de membrana do sêmen congelado e descongelado.

No presente estudo, as amostras de sêmen, congeladas e descongeladas, submetidas ao teste de termorresistência, apresentaram resultados desfavoráveis quanto à fertilidade, com 30 minutos de incubação.

As várias relações não significativas registradas entre os testes complementares e os parâmetros físicos do sêmen, nas diferentes análises, demonstram que os parâmetros analisados são insubstituíveis entre si, de forma que analisam a qualidade espermática sob diferentes aspectos, contribuindo de forma complementar para a avaliação *in vitro* dos espermatozóides eqüinos como um todo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; BITTENCOURT, AP.M., et al. Teste hiposmótico em sêmen congelado eqüino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. **Anais...** CD-ROOM.

AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A.O; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, Lea & Febiger: Malvern, 1993, 1137p.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Eq. Vet. Sci.** v. 7, p. 145-173, 1987.

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

BARTH, A.D.; OKO, R.J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa** Ames IA: Iowa State University Press, 1989, 285 p.

BERNDSTON, W.E.; FOOTE, R.H. The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol. **Cryobiol.** v 5, p. 398-402, 1969.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO, A.L.; SANTOS, A.D.F. et al. Utilização de glicerol e etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira.** v. 5, p. 27-32, 2004.

BLOM, E. Pathological conditions in the genital organs and in semen as ground for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark, **Nord Vet. Med.** V. 35, p. 105-130, 1973.

BORGES, G.S.; SNOECK, P.P.N.; ALMEIDA, A.K.; et al. Efeito da adição de diferentes proporções de água destilada em sêmen para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática de espermatozóides eqüino criopreservados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. **Anais...** CD-ROOM

BURNS, P.J.; REASNER, D.S; Computerized analysis of sperm motion: effects of glycerol concentration on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Eq. Nutr. Physio. Soc.** v. 15, p. 377-380, 1995.

CHENIER, T.; MERKIES, K.; LEIBO, S.; et al. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY PRACTICES, 44, 1998, Baltimore USA. **Proceed...** p. 5-6.

COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P.; et al. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5o C freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriog.** v. 22, p. 25-38, 1984.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal.** 2^a ed. Belo Horizonte. 1998. 49p.

COTORELLO, A.C.P. Criopreservação de sêmen eqüino utilizando associação de etilenoglicol e glicerol. Belo horizonte, MG: 2002. 47p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária /Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

COTORELLO, A.C.P; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen eqüino (revisão de literatura). **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 26, p. 14-25, 2002.

CRABO, G. Physiological aspects of stallion semen cryopreservation. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY PRACTICES, 41, 2001, USA, **Proceed...** p. 291-295.

CRISTANELLI, M.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. **Theriog.** V. 22, p. 39-45, 1984.

DÉ CARLI FILHO, J.C.P., Cavalo: critérios para credenciar laboratórios de DNA, 2004, disponível em: <http://www.cna.org.br/cna/publicacao/noticia.wsp?tmp.noticia=2556>, acessado em 11 de agosto de 2005.

DELL’AQUA JÚNIOR, 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, SP: 2000. 81p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica /Universidade Estadual Paulista, 2000.

DROBNIS, E.Z.; CROWE, L.M.; BERGER, T.; et al. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. **J. Exp. Zoo.** v. 265, p. 432-437, 2005.

FABBROCINI, A.; DEL SORBO, C.; FASANO, G.; et al. Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of mediterranean buffalo (*B. bubalis*) spermatozoa. **Theriog.** v. 57, p. 193-207, 2000.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; et al. Efeito do resfriamento na criopreservação do sêmen eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 27, p. 348-350, 2003.

GRAHAM, J.K. Analysis of stallion semen and its relation to fertility. **Vet. Clinics North America** v. 12, p. 119-130, 1996.

GUAY, P.; RONDEAU, M. Effect of glycerol on motility, viability, extracellular aspartate aminotransferase release and fertility of stallion semen before and after freezing. **Eq. Vet. J.** v. 13, p. 177-182, 1981.

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

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

HEITLAND, A.V.; JASKO, E.L.; SQUIRES, J.K.; et al. Factor affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Eq. Vet. J.** v. 28, p. 47-53, 1996.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Anim. Reprod. Sci.** v. 62, p. 3-22, 2000 a.

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

JASKO, D.J. Determination of the relationship between sperm morphologic classification and fertility in stallions: 66 cases. **J. Am. Vet. Assoc.** v. 3, p. 389-394, 1990.

JEYENDRAN, S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.** v. 70, p. 219-228, 1984.

JULIANI, G.C.; SNOECK, P.P.N.; HENRY, M. Efeito da trealose ou rafinose associada a acetamida/metilcelulose na criopreservação de sêmen equino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 27, p. 355-356, 2003.

KEITH, S. L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Fort Collins, Colorado-USA: 1998. 104p. Dissertação (Master of Science) – Colorado State University, 1998.

LAMARRA, T., U.S. Equine Economic Impact Study Released, 2005, Disponível em: <http://www.thehorse.com/viewarticle.aspx?ID=5967&dpt=2&nID=23&n=General&case=2>, acessado em 11 de agosto de 2005.

MANTOVANI, R.; ROTA, A.; FALOMO, M.E. et al. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with hyposmotic swelling test. **Reprod. Nutr. Dev.** v. 42, p. 217-226, 2002.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 27, p. 47-51, 1979.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Anim. J. Cell Physiol.** v. 247, p. 125-142, 1984.

MEDEIROS, A.S.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F. O.; et al. Avaliação da integridade acrossomal de espermatozóides de garanhões criopreservados com crioprotetores a base de amidas e glicerol. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 27, p. 353-354, 2003.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriog.** v. 57, p. 324-344, 2002.

MELLO, F.G.; SILVA, A.; GOMES, M.G.T. et al. Efeitos da adição fracionada de dimetilformamida ao meio diluidor e de curvas de resfriamento na preservação da viabilidade de espermatozóides eqüinos congelados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia/GO-Brasil. **Anais...** CD-ROOM

MELO, M.I.V. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino, Belo Horizonte, MG: 1999. 104p. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária/Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.

MELO, M.I.V.; SNOECK, P.P.N.; PORTELA, A.P.M. et al. Tipos de reações do espermatozóide eqüino ao teste hiposmótico: efeito do soluto e da osmolaridade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia. **Anais...** CD-ROOM

NAGASE, H.; SOEJIMA, S.; NIWA, R.; et al. Studies on the freezing of stallion semen. I. Fertility results of stallion semen frozen in concentrated pellet form. **Anim. Breed. Abstr.** v. 35, p. 194, 1967.

NEILD, D.M.; CHAVES, G.; FLORES, M.; et al. Hyposmotic test in equine spermatozoa. **Theriog.** v. 51, p. 721-727, 1999.

NEILD, D.M.; GADELLA, B.M.; CHAVES, G. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. **Theriog.** v. 59, p. 1693-1705, 2003.

NISHIKAWA, Y.; IRITANI, A.; SHINOMIYA, S. Studies on the protective effects of egg yolk and glycerol on the freezability of horse sperm. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION ARTIFICIAL INSEMINATION, 4, 1975. **proceed...** p. 1545-1549.

NOILES, E.E.; THOMPSON, K.A.; STOREY, B.T. Water permeability, L_p , of mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. **Cryobiol.** v. 35, p. 79-92, 1997.

OHATA, P.M.; BERNARDI, M.L.; BORTOLOZZO, F.P.; et al. Congelabilidade do sêmen suíno de acordo com o período de equilíbrio pré-congelamento e da sensibilidade ao resfriamento. **Arch. Vet. Sci.** v. 10, p. 69-74, 2005.

OLIVEIRA, J.V.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; et al. Effect of cryoprotectant on donkey sêmen freezability and fertility. **Anim. Reprod. Sci.** v. 94, p. 82-84, 2006.

PAPA, F.O., SANROS, T.B. MACEDO, L.P., DELL'AQUA JÚNIOR, J.A., MELO, C.M., MARTIN, I., Influencia da distância entre o nível de nitrogênio líquido e as palhetas de sêmen durante o processo de congelação sobre os parâmetros espermáticos de sêmen eqüino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, p. 368-370, 2003.

PAPA, F.O.; MARTIN, J.C.; KRAUSE, A. et al. Influência da centrifugação sobre a motilidade do sêmen de eqüinos em resistência térmica e congelamento. **Rev. Ciênc. Bioméd.** v. 2, p. 31-39, 1981.

PICKETT, B. W., AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**, Lea & Febiger: Malvern (USA), 1993, 1137p.

PIMENTEL, C.A.; RIBEIRO, D.B.; FERNANDES, C.E. et al. Impacto da IA na equídeocultura. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 22, p. 91-97, 1998.

QUINN, P.J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. **Cryobiol.** v. 22, p. 128-146, 1985.

ROBBINS, R.K.; SAACKKE, R.G; CHANDLER, P.T. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. **J. Anim. Sci.** v. 42, p. 145-154, 1976.

ROSSI, T.C.; PAPA, F.O.; SANTOS, T.B.; et al. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelação de sêmen eqüino com meio MP 50. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 27, p. 350-352, 2003.

SAEG, **Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas**. Viçosa-MG: UFV, 2007.

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

SANTOS, G.F. Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre características físicas e morfológicas dos espermatozóides de jumentos (*Equus asinus*), Belo Horizonte, MG: 1994. 82p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária/Universidade Federal de Minas Gerais, 1994.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M. Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. **Reprod. Dom. Anim.** v. 41, p. 74-78, 2006.

SNOECK, P.P.N. Aspectos da criopreservação de sêmen eqüino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. Belo Horizonte, MG: 2003. 116p. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária/Universidade Federal de Minas Gerais. 2003.

SNOECK, P.P.N.; FERREIRA, M.K.V.; HENRY, M. Avaliação do efeito do transporte de sêmen eqüino no período pré-congelamento sobre a viabilidade espermática avaliada *in vitro* após o descongelamento. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 27, p. 346-348, 2003.

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

THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriog.** v. 65, p. 1531-1550, 2006.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; et al. Centrifugation and addition of glycerol at 22° C instead of 4° C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriog.** v. 57, p. 907-919, 2000.

VOLKMANN, D.H. Acrosomal damage and progressive motility of stallion semen frozen by two methods in 0,5 mL straws. **Theriog.** v. 27, p. 689-699, 1987.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fert. Dev.** v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P.F.; MORRIS, G.J. Cold shock injury in animal cells. **Symp. Soc. Exp. Biol.** v.41 p. 311-340, 1987.

WATSON, P.F.; The preservation of semen in mammals. 1979 In: KEITH, S. L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Fort Collins, Colorado-USA: 1998. 104p. Dissertação (Master of Sience) – Colorado State University, 1998.

ZÚCCARI, C.E.S. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina. Botucatu, SP: 1998. 121p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade Estadual Paulista, 1998.