

DANIEL MACÊDO RATES

**EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE COLESTEROL À MEMBRANA  
PLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES SOBRE O CONGELAMENTO  
E FERTILIDADE DO SÊMEN DE JUMENTOS (*Equus asinus*)  
DA RAÇA PÊGA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

DANIEL MACÊDO RATES

EFEITO DA INCORPORAÇÃO DE COLESTEROL À MEMBRANA  
PLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES SOBRE O CONGELAMENTO E  
FERTILIDADE DO SÊMEN DE JUMENTOS (*Equus asinus*)  
DA RAÇA PÊGA

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

Aprovada em 18 de fevereiro de 2011.

---

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres  
(Coorientador)

---

Prof. José Domingos Guimarães  
(Coorientador)

---

Prof. Eduardo Paulino da Costa

---

Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula

---

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho  
(Orientador)

Aos meus pais, Márcio Antônio Moreira Rates (*in memoriam*) e Emiza Macêdo Rates, pelo amor incondicional e exemplo de dedicação, caráter e humildade.

Ao meu irmão, Mateus, pelo companheirismo e amizade.

Dedico

“A Pedra...

O distraído nela tropeçou... O bruto a usou como projétil. O empreendedor, usando-a, construiu. O camponês, cansado da lida, dela fez assento. Para meninos, foi brinquedo. Drummond a poetizou. Já David matou Golias, e Michelangelo extraiu-lhe a mais bela escultura... E em todos esses casos, a diferença não esteve na pedra, mas no Homem! Não existe 'pedra' no seu caminho que você não possa aproveitá-la para o seu próprio crescimento."

*Fenelon Portilho*

"Antes que você possa alcançar o topo de uma árvore e entender os brotos e as flores, você terá de ir fundo nas raízes, porque o segredo está lá. E, quanto mais fundo vão as raízes, mais alto vai à árvore"

*Nietzsche*

“Falamarnada...”

*Márcio Antônio Moreira Rates*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Márcio Antônio Moreira Rates (*in memoriam*), por ter sido tudo e mais um pouco na minha vida, por me ensinar a vivê-la da melhor maneira e pelo exemplo de caráter, humildade e carisma. E claro, por ter me apresentado aos equídeos ainda na infância, pois sem eles nada disso seria possível.

A minha mãe, Emiza Macêdo Rates, pelo amor, dedicação, apoio e por ter sido meu maior incentivo durante esta jornada.

Ao meu irmão, Mateus Macêdo Rates, pela amizade, companheirismo e pelos ótimos momentos de risadas e cantorias.

A todos os professores que me ensinaram durante toda minha vida acadêmica, em especial ao professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pela oportunidade, confiança e amizade durante estes anos de estudo sobre a reprodução equina e equideocultura.

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa. A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade.

A professora da UNIVASF, Elenice Andrade Moraes, pela atenção dedicada à realização deste estudo. Sua ajuda foi imprescindível.

Aos membros da banca de defesa de dissertação, professores Ciro Alexandre Alves Torres, Eduardo Paulino da Costa, José Domingos Guimarães e Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Aos grandes amigos dos tempos de graduação: Carioca, Emílio, Newton, Rafael, Renatão e Thiago, pelo companheirismo, pelos bons momentos e alegrias proporcionados.

Aos companheiros do novo lar, República K-Zona Rural: Nelcino, Goianin, Tibil e P.G.

A meus avôs, tios, primos e amigos de Teófilo Otoni e Belo Horizonte, pelas orações, pela amizade e por quererem sempre o bem e apesar da distância sempre estarem presentes em pensamento e lembranças.

Aos vários estagiários sem os quais não seria possível a realização deste trabalho: Rodrigo (Trocín), Sônia, Flávio, Luiza Neme, Fernanda Barros, Pablo Resende (Pudin), Pablo Magalhães, Fábio, Gerson, João Emídio.

A Isabela, pelo carinho, paciência, ajuda, compreensão e por me trazer mais serenidade.

Aos colegas de orientação Manuela Matta, Pedro Gama Ker, Guilherme Pugliesi e meu “quase irmão” Renan Reis de Oliveira pela ajuda, incentivo, força e amizade durante todos esses anos.

A todos os funcionários do departamento de Zootecnia, em especial do setor de Equideocultura: Fernando Freitas, Sebastião (Maninho), Zé, Arcínio, Donizete, Zé Paulo, pela amizade e pela ajuda fundamental durante a realização deste trabalho.

Ao proprietário do haras Tarumã, Luiz Felipe Haddad, por disponibilizar a estrutura e animal para realização deste estudo. Ao Betão, pela ajuda durante o trabalho.

Àqueles que injustamente me esqueci, mas que foram importantes para esta conquista.

A Deus, por me dar saúde, me trazer paz e guiar o meu caminho sempre, e por ter criado os mais belos entre os animais: os equídeos.

## BIOGRAFIA

DANIEL MACÊDO RATES, filho de Márcio Antônio Moreira Rates (*in memoriam*) e Emiza Macêdo Rates, nasceu na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, em 03 de setembro de 1985.

Em março de 2004, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2009, iniciou o programa de pós-graduação do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, concentrando seus estudos na área de Fisiologia da Reprodução Animal.

Em 18 de fevereiro de 2011, submeteu-se à defesa desta dissertação.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. A célula espermática .....	4
2.2. Colesterol e a membrana plasmática .....	5
2.3. Incorporação de colesterol à membrana plasmática .....	7
2.4. Criopreservação de sêmen asinino .....	9
2.4.1. Resfriamento do sêmen.....	10
2.4.2. Congelamento do sêmen.....	11
2.4.3. Descongelo do sêmen .....	13
2.5. Avaliação espermática.....	14
2.5.1. Motilidade espermática .....	14
2.5.2. Funcionalidade da membrana plasmática .....	16
2.5.3. Integridade física da membrana .....	17
2.5.4. Morfologia espermática .....	18
2.5.5. Longevidade espermática.....	19
2.6. Dose inseminante, local de deposição e fertilidade do sêmen congelado .....	20
2.7. Efeito do tratamento com Ciclodextrina Carregada com Colesterol (CCC) na qualidade do sêmen descongelado .....	23
2.8. Efeito da Ciclodextrina Carregada com Colesterol na capacidade de fertilização do espermatozoide .....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
3.1. Experimento 1.....	30
3.1.1. Manejo dos animais.....	30
3.1.2. Coleta de sêmen.....	31
3.1.3. Preparo da solução de Ciclodextrina Carregada com Colesterol (CCC) .....	31
3.1.4. Processamento do sêmen e tratamento com CCC.....	32
3.1.5. Congelamento do sêmen.....	33
3.1.6. Descongelo do sêmen .....	34
3.1.7. Testes <i>in vitro</i> para avaliar a viabilidade espermática do sêmen descongelado .....	34
3.1.7.1. Avaliação subjetiva da motilidade espermática .....	34
3.1.7.2. Teste Hiposmótico (HOST).....	34
3.1.7.3. Coloração supravital (vivos e mortos).....	35



3.1.7.4.	Teste de termorresistência (TTR) .....	35
3.1.7.5.	Morfologia espermática .....	36
3.1.8.	Controle da ovulação e inseminações .....	36
3.1.9.	Diagnóstico de gestação .....	38
3.1.10.	Análise estatística .....	38
3.2.	Experimento 2.....	39
3.2.1.	Manejo dos animais.....	39
3.2.2.	Coleta de sêmen.....	39
3.2.3.	Preparo da solução de Ciclodextrina Carregada com Colesterol (CCC) .....	40
3.2.4.	Processamento do sêmen e tratamento com CCC.....	40
3.2.5.	Congelamento do sêmen.....	40
3.2.6.	Descongelo do sêmen .....	40
3.2.7.	Testes <i>in vitro</i> para avaliar a viabilidade espermática do sêmen descongelado .....	41
3.2.7.1.	Avaliação subjetiva do movimento espermático .....	41
3.2.7.2.	Teste hiposmótico (HOST) .....	41
3.2.7.3.	Coloração supravital (vivos e mortos).....	41
3.2.7.4.	Teste de termorresistência (TTR) .....	41
3.2.7.5.	Morfologia espermática .....	41
3.2.8.	Controle da ovulação e inseminações .....	41
3.2.9.	Diagnóstico de gestação .....	42
3.2.10.	Análise estatística .....	42
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
4.1.	Motilidade total e vigor.....	44
4.2.	Integridade física e funcional da membrana plasmática .....	47
4.3.	Morfologia espermática .....	50
4.4.	Longevidade espermática.....	51
4.5.	Fertilidade.....	54
5.	CONCLUSÕES.....	61
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
7.	ANEXOS.....	79
7.1.	Hepes Buffered Saline Solution (Diluidor STALP) .....	79
7.2.	Diluidor de MARTIN et al. (1979).....	80
7.3.	Solução hiposmótica (100 mOsmol/Kg).....	80
7.4.	Alguns parâmetros inerentes às éguas inseminadas e à realização dos diagnósticos de gestação das mesmas durante os experimentos 1 e 2. ....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxa de gestação de éguas e jumentas inseminadas com sêmen congelado de jumento após a ovulação.....	23
Tabela 2: Concentrações de CCC utilizadas para tratamento de espermatozóides e qualidade espermática observada após descongelamento para algumas espécies.....	25
Tabela 3: Efeito da ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) na fertilidade in vitro.....	28
Tabela 4: Efeito do tratamento do sêmen com CCC sobre a fertilidade dos espermatozóides in vivo. ....	29
Tabela 5: Médias e desvios padrão da motilidade total e vigor espermático do sêmen dos jumentos utilizados no experimento 1 em diferentes etapas do processo de congelamento após o tratamento com ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) ou não.....	44
Tabela 6: Médias e desvios padrão da motilidade total e vigor espermático do sêmen do jumento utilizado no experimento 2 em diferentes etapas do processo de congelamento após o tratamento com ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) ou não.....	45
Tabela 7: Valores médios e desvios padrão dos percentuais de espermatozóides não corados ao teste supravital e reativos ao teste hiposmótico do sêmen utilizado no experimento 1 em função das etapas do processo de congelamento.....	47
Tabela 8: Valores médios e desvios padrão dos percentuais de espermatozóides não corados ao teste supravital e reativos ao teste hiposmótico do sêmen utilizado no experimento 2 em função das etapas do processo de congelamento.....	48
Tabela 9: Valores médios e desvios padrão dos percentuais de anormalidades espermáticas do sêmen do experimento 1.....	50
Tabela 10: Valores médios e desvios padrão dos percentuais de anormalidades espermáticas do sêmen do experimento 2.....	51

Tabela 11: Valores médios e desvios padrão das motilidades totais do sêmen asinino criopreservado com adição de 1 mg de CCC/120 x 10 <sup>6</sup> espermatozóides e sem adição de CCC durante incubação a 37 °C para o teste de termorresistência (TTR) no experimento 1.....	51
Tabela 12: Valores médios e desvios padrão das motilidades totais do sêmen asinino criopreservado com adição de 1 mg de CCC/120 x 10 <sup>6</sup> espermatozóides e sem adição de CCC durante incubação a 37 °C para o teste de termorresistência (TTR) no experimento 2.....	52
Tabela 13: Valores médios e desvios padrão do vigor do sêmen criopreservado com adição de 1 mg de CCC/120 x 10 <sup>6</sup> espermatozóides e sem adição de CCC durante incubação a 37 °C para o teste de termorresistência (TTR) no experimento 1. ....	52
Tabela 14: Valores médios e desvios padrão do vigor do sêmen criopreservado com adição de 1 mg de CCC/120 x 10 <sup>6</sup> espermatozóides e sem adição de CCC durante incubação a 37 °C para o teste de termorresistência (TTR) no experimento 2. ....	53
Tabela 15: Tempo médio entre último controle folicular e a realização da inseminação e a média de tempo da detecção da ovulação à realização da inseminação para os experimentos 1 e 2. ....	55
Tabela 16: Taxas de gestação por ciclo obtidas após inseminação com sêmen tratado com 1mg CCC/120 x 10 <sup>6</sup> espermatozóides e com sêmen controle nos experimentos 1 e 2.....	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural de uma ciclodextrina ( $\beta$ -ciclodextrina) (Challa et al., 2005).....	7
Figura 2: Recipiente utilizado para o resfriamento do sêmen. Cada tubo suporta até 10 palhetas de 0,5 mL. Temperatura interna da geladeira sempre mensurada com auxílio de um termômetro digital. ....	33
Figura 3: Rampa metálica flutuante com 4 cm de altura utilizada para congelamento do sêmen. Capacidade para 80 palhetas de 0,5 mL. ....	34
Figura 4: Égua devidamente contida em tronco para realização da IA. À esquerda: Cauda suspensa com bandagem e períneo higienizado. À direita: Inspeção do vestíbulo da vagina para detectar possíveis sujidades.....	37
Figura 5: Esquema simplificado do delineamento dos experimentos. ....	43

## RESUMO

RATES, Daniel Macêdo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Efeito da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozóides sobre o congelamento e fertilidade do sêmen de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Coorientadores: José Domingos Guimarães e Ciro Alexandre Alves Torres.

Objetivou-se com este estudo avaliar a eficácia da incorporação de colesterol, utilizando-se dois diferentes diluidores de incubação, na criopreservação do sêmen de jumentos da raça Pêga, determinada por meio de testes *in vitro* e avaliação da fertilidade *in vivo*. Foram utilizados 12 ejaculados de dois jumentos no Experimento 1 e oito ejaculados de um jumento no Experimento 2. O sêmen de cada ejaculado foi diluído em diluidor Stalp e em diluidor de centrifugação de Martin, respectivamente, nos Experimentos 1 e 2 para obtenção da concentração final de  $120 \times 10^6$  de espermatozóides/mL e subsequente dividido em dois tratamentos: T1 – adição de 1 mg de ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) para cada 1 mL de sêmen e T2 – sem adição de CCC. O resfriamento e congelamento do sêmen nos dois experimentos seguiram metodologia descrita por FÜRST et al. (2005), utilizando-se diluidor de congelamento de Martin. A qualidade seminal foi avaliada no sêmen fresco, resfriado e congelado. Foram avaliadas as seguintes características seminais: motilidade total, vigor espermático, morfologia espermática, integridade da membrana plasmática pelo teste supravital, funcionalidade da membrana plasmática pelo teste hiposmótico (HOST), e motilidade total e vigor espermático durante o teste de termorresistência (TTR) por 120 minutos. Em cada experimento foram inseminadas trinta éguas com sêmen do T1 e trinta com sêmen do T2. A inseminação artificial foi realizada depositando-se uma dose de  $300 \times 10^6$  de espermatozóides móveis no ápice do corno ipsilateral à ovulação. No Experimento 1, a

adição de 1 mg de CCC promoveu maior motilidade total do sêmen e maior funcionalidade da membrana espermática ( $p < 0,05$ ). No Experimento 2 não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos nas características seminais avaliadas. O sêmen descongelado do T1 e T2 apresentou vigor, integridade da membrana plasmática e percentual de defeitos morfológicos totais semelhantes ( $p > 0,05$ ) em ambos os experimentos. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos durante o período do TTR em nenhum dos dois experimentos. As taxas de gestação no Experimento 1 (T1 - 3,3% e T2 - 10,0%), e no Experimento 2 (T1 - 20,0% e T2 - 13,3%) não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). A utilização dos meios Stalp e de centrifugação de Martin para incubação e centrifugação do sêmen asinino não resultou em taxas de gestação satisfatórias em éguas inseminadas pós-ovulação. Novos trabalhos visando melhorar a fertilidade do sêmen asinino quando se busca a incorporação de CCC são indicados.

## ABSTRACT

RATES, Daniel Macêdo, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2011. **Effect of cholesterol incorporation in sperm plasma membrane on freezing and fertility of Pêga donkey (*Equus asinus*) semen.** Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-advisers: José Domingos Guimarães and Ciro Alexandre Alves Torres.

The objective of the present study was to evaluate the effectiveness of the cholesterol incorporation, using two different extenders for semen cryopreservation of Pêga donkeys. The effectiveness was determined by *in vitro* and *in vivo* tests for assessment of fertility. Twelve ejaculates from two donkeys in Experiment 1 and eight ejaculates from one donkey in Experiment 2 were collected. The semen of each ejaculate was diluted in Stalp extender and in Martin centrifugation extender, respectively, in Experiments 1 and 2 to obtain a final concentration of  $120 \times 10^6$  sperm/mL and subsequently split into two treatments: T1 - adding 1 mg of cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) to each one mL of semen and T2 - without addition of CLC. The semen in two experiments was cooled and frozen following the methodology described by FÜRST et al. (2005), using the Martin freezing extender. The sperm quality was evaluated in fresh, cooled and thawed semen. The characteristics evaluated were: total motility, sperm vigor, sperm morphology, plasma membrane integrity by supravital test, plasma membrane functionality by hypoosmotic test (HOST) and total motility and sperm vigor during the thermo-resistance test (TTR) for 120 minutes. In each experiment, thirty mares were inseminated with semen from T1 and thirty with semen of T2. The artificial inseminations were done depositing a dose of  $300 \times 10^6$  motile sperm at the apex of the horn ipsilateral to ovulation. In Experiment 1, the addition of 1 mg of CLC resulted in greater ( $p < 0.05$ ) total sperm motility and better preservation of the sperm

membrane functionality. In Experiment 2 there was no difference ( $p>0.05$ ) between treatments in the semen characteristics evaluated. The thawed semen of T1 and T2 had no difference ( $p>0.05$ ) between the experiments in the sperm vigor, plasma membrane integrity and total morphological defects. There was no difference ( $p>0.05$ ) between treatments during the TTR in any experiment. The pregnancy rates in Experiment 1 (T1 - 3.3% and T2 – 10.0 %) and in Experiment 2 (T1 – 20.0% and T2 – 13.3%) did not differ ( $p>0.05$ ) between treatments. The use of Stalp and Martin extenders for incubation and centrifugation of donkey semen has not resulted in satisfactory pregnancy rates in mares inseminated after ovulation. Further studies are needed to improve the fertility of donkey semen frozen with incorporation of CLC.



## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho de cerca de 8,4 milhões de equídeos, sendo 5,9 milhões de equinos (terceiro maior rebanho do mundo), 1,3 milhões de muares e 1,2 milhões de asininos. O agronegócio equestre gera 642,5 mil empregos diretos e 2,6 milhões indiretos (CNA, 2006).

A importância dos equídeos para o desenvolvimento do nosso país pode ser notada desde os tempos do Brasil colônia, quando tais animais permearam os ciclos extrativistas, agrícolas e de mineração.

A raça Pêga é uma raça asinina genuinamente nacional, que apresenta cerca de 200 anos de evolução e seleção. Sua origem ocorreu pelos cruzamentos entre as raças italiana e egípcia pelo padre Manoel Maria Torquato de Almeida, que iniciou seu trabalho em 1810. O padre passou a selecionar os animais nascidos destes cruzamentos e em 1847 transferiu sua criação para o Coronel Eduardo José de Resende, na fazenda Engenho Grande dos Cataguases, município de Lagoa Dourada, que levou adiante o trabalho de melhoramento iniciado pelo seu precursor (NUNES, 2007).

O jumento Pêga associa ao porte médio e à rusticidade, o andamento marchado. Tais características, associadas aos traços delicados, fazem com que esta raça possua a maior associação de criadores de jumentos do país, com mais de 15000 jumentos registrados e distribuídos em todas as regiões do Brasil (NUNES, 2007).

A fim de produzir animais que conciliem a rusticidade dos jumentos (*Equus asinus*) ao porte dos equinos (*Equus caballus*), diversos criadores têm optado pela produção do híbrido (muar), que é bastante desejável.

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia que contribui para a difusão de material genético superior e aceleração do melhoramento genético. No entanto, o sucesso no processo de criopreservação de sêmen depende da qualidade do sêmen fresco, da sua interação com os meios diluidores, dos crioprotetores e das curvas de

resfriamento, congelamento e descongelamento utilizadas (PICKETT & AMANN, 1992). Além destes fatores, existe maior susceptibilidade de algumas espécies aos danos sofridos durante o processo de criopreservação. Diferença esta que se deve, em parte, à composição de lipídeos na membrana plasmática, e principalmente, à relação colesterol : fosfolipídeos encontrada nesta.

Sabe-se que o colesterol presente na membrana plasmática dos espermatozóides tem a função de estabilizá-la, protegendo a célula durante o processo de resfriamento (GRAHAM & FOOTE, 1987). Espécies com baixa (suínos e equinos), intermediária (bovinos, ovinos e caprinos) e alta (homem, camundongo, galo e coelho) relação colesterol : fosfolipídeos variam nesta ordem quanto à susceptibilidade ao choque térmico.

Para incorporar o colesterol na membrana espermática tem se utilizado as ciclodextrinas, que são oligossacarídeos cíclicos que quando carregadas com colesterol, o transferem abaixo do gradiente de concentração para a mesma (KLEIN et al., 1995; PURDY & GRAHAM, 2004a; MOORE et al., 2005).

A inclusão de ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) no diluidor tem sido reportada como uma alternativa para aumentar a integridade da membrana plasmática do espermatozóide e melhorar os parâmetros físicos do sêmen congelado de asininos (ÁLVAREZ et al., 2006; OLIVEIRA, 2010), equinos (COMBES et al., 2000; ZAHN et al., 2002; MOORE et al., 2005; AMORIM, 2008; GLAZAR et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010; SPIZZIRI et al., 2010a), bovinos (PURDY & GRAHAM, 2004a; PURDY et al. 2005; MOCÉ & GRAHAM, 2006; AMORIM et al., 2009; MORAES et al., 2010), caprinos (MORRIER & BAILEY, 2005; MOCÉ et al., 2010b, PURDY et al., 2010), suínos (ZENG & TERADA, 2000 e 2001; MAO et al., 2005; GALANTINO-HOMER et al., 2006; WALTERS et al., 2008; MORAES et al., 2009; TORRES et al.,

2009; TOMÁS et al., 2009a), camundongos (MOVASSAGHI et al., 2009; LOOMIS & GRAHAM, 2008) e coelhos (MOCÉ & GRAHAM, 2005)

Apesar do aumento de interesse pela incorporação de colesterol à membrana espermática, pouco se sabe sobre o efeito deste colesterol na fertilidade do sêmen criopreservado, não sendo encontrado nenhum estudo, até o momento, que testasse a fertilidade do sêmen asinino criopreservado com adição de colesterol em éguas.

Objetivou-se com o presente trabalho avaliar o efeito da incorporação de colesterol e utilização de dois diluidores de incubação/centrifugação sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen de jumentos da raça Pêga.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. A célula espermática**

Os espermatozóides são células alongadas compostas por uma cabeça oval e achatada, que apresenta um núcleo contendo um complexo DNA na forma de cromatina altamente condensada, e uma cauda (EDDY & O'BRIEN, 1994; HAFEZ, 1995).

A célula espermática é envolvida pela membrana plasmática em sua totalidade. Esta membrana é formada basicamente por uma bicamada lipídica entremeada por proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície, glicolipídios e colesterol, dispostos em um “mosaico fluido” (SINGER & NICHOLSON, 1972), e tem uma pronunciada organização de domínios com muitos antígenos glicoprotéicos, sendo subdividida em domínios regionais bem delineados que diferem em função e composição.

A membrana plasmática na cabeça possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-acrossomal. Na região acrossomal a membrana plasmática pode ser subdividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial. Os segmentos marginal e principal, juntos, são denominados de capa acrossomal ou “capuchão cefálico”.

O acrossoma possui enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fecundação e oferece proteção ao DNA contra choques mecânicos (EDDY & O'BRIEN, 1994; HAFEZ, 1995).

A cabeça do espermatozóide é conectada pelo colo à cauda, e esta é dividida em peça intermediária, principal e terminal (HAFEZ, 1995). O colo ou peça de conexão forma uma placa que se ajusta dentro de uma depressão na superfície do núcleo (EDDY & O'BRIEN, 1994) e é contínua com nove feixes de fibras que posteriormente se projetam pela maior parte da cauda. A membrana plasmática da cauda cobre a bainha mitocondrial e as peças principal e terminal da cauda.

O axonema, que constitui grande parte da cauda do espermatozóide (desde a parte central da peça intermediária até o fim da peça terminal), é uma estrutura complexa composta por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina (ALBERTS, 2004). Está envolvido no mecanismo de motilidade espermática, e apresenta nove pares de microtúbulos periféricos e um par central. Para ação direta deste movimento a dineína e a tubulina utilizam adenosina trifosfato (ATP) produzido pelas mitocôndrias presentes na peça intermediária (HAFEZ, 1995).

Na peça intermediária, que vai do colo até o *annulus*, existe um grande número de mitocôndrias que se encontram dispostas em forma de hélice, possuindo a função de produzir a energia necessária para a motilidade espermática (EDDY & O'BRIEN, 1994). Então, na região da peça intermediária, se encontram internamente o axonema, sendo este associado e envolvido por nove densas fibras, e externamente as mitocôndrias.

## **2.2. Colesterol e a membrana plasmática**

Para desempenhar suas funções a membrana plasmática deve se apresentar em estado de fluidez, sendo este estado afetado principalmente pela composição relativa entre o colesterol e os fosfolipídios e pela temperatura à qual a membrana é exposta.

Trabalhando com bactérias, ROTTEM et al. (1973) observaram que aquelas que possuíam baixo teor de colesterol nas membranas celulares apresentavam pequena tolerância a baixas temperaturas. A partir daí, a quantidade de colesterol nas membranas dos espermatozoides passou a ser relacionada com a susceptibilidade desta célula ao choque térmico (WHITE, 1993).

Atualmente a relação entre os níveis de colesterol da membrana plasmática dos espermatozoides e esta susceptibilidade está bem estabelecida. Espécies que possuem altas proporções de colesterol em

relação aos fosfolípidios, a exemplo dos humanos e coelhos (0,99 e 0,88, respectivamente; WATSON, 1981), são mais resistentes ao choque térmico (MESEGUER et al., 2004; MOCÉ & GRAHAM, 2006). Por outro lado, espécies com menor proporção de colesterol, como suínos (0,26) e equinos (0,36), são menos resistentes (CROSS, 1998).

O colesterol tem múltiplos efeitos nas membranas, incluindo sua estabilização, redução da sua permeabilidade, melhoria de suas características morfológicas e possibilidade de interações célula-célula, influenciando na fase de transição da membrana, fornecendo microambiente adequado (químico e/ou físico) para as proteínas integrais e periféricas da membrana e servindo como antioxidante (CROCKETT, 1998).

A remoção deste lipídeo da membrana promove desestabilização da mesma devido à reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (AMANN & GRAHAM, 1992; GADELLA et al., 2001), com aumento da capacidade de fusão e permeabilidade da membrana (CROSS, 1998).

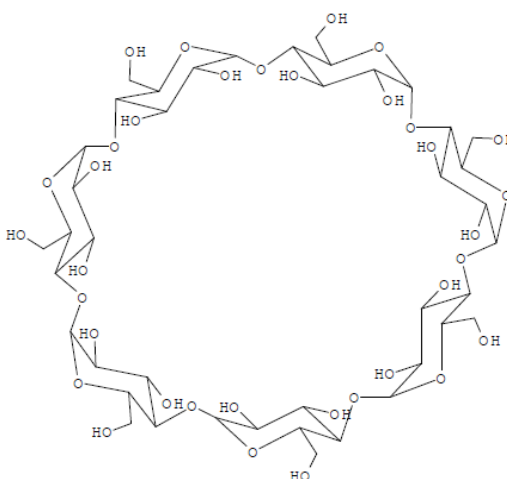
Ainda, quando o espermatozóide perde colesterol, pode sofrer uma capacitação prematura, reduzindo sua viabilidade nos órgãos reprodutivos da fêmea (WATSON, 1995). Perdas de colesterol da membrana plasmática de células criopreservadas têm sido observadas em suínos (50%) e garanhões (28%) (CEROLINI et al., 2001; MOORE et al., 2005). Uma maior concentração de colesterol na membrana pode impedir que as células sofram capacitação precoce, aumentando a sua viabilidade após a criopreservação (MOORE et al., 2005).

QUINN & WHITE (1967), trabalhando com espermatozoides de caprinos, concluíram que aquelas células espermáticas oriundas do testículo e da cabeça do epidídimo são pouco afetadas pelo choque térmico, enquanto aquelas da cauda do epidídimo e da ampola são muito mais susceptíveis. Isso pode ser explicado pela perda de fosfolípidios e

de colesterol pelo espermatozóide durante o trajeto pelos órgãos reprodutivos do macho.

### 2.3. Incorporação de colesterol à membrana plasmática

Uma maneira de incorporar o colesterol à membrana dos espermatozóides é por meio do complexo de inclusão com ciclodextrinas (PURDY & GRAHAM, 2004a). Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, compostos de unidades glicosídicas, que possuem uma face externa hidrofílica e um núcleo interno hidrofóbico (Figura 1) (DOBZIUK, 2006), sendo este capaz de encapsular compostos hidrofóbicos, como o colesterol (CHALLA et al., 2005).



**Figura 1:** Fórmula estrutural de uma ciclodextrina ( $\beta$ -ciclodextrina) (Challa et al., 2005).

As formas mais comuns de ciclodextrina produzidas possuem 6, 7, ou 8 unidades glicosídicas, designadas respectivamente de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  ciclodextrinas (SAENGER, 1980). Existem também ciclodextrinas modificadas, sintetizadas a partir das  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  ciclodextrinas, por meio da substituição dos grupos hidroxila por grupos hidroxipropila, metila e sulfobutila. Essas modificações melhoram sua solubilidade, reduzem sua

toxicidade e aprimoram sua habilidade de dissolver esteróides em solução aquosa (CHALLA et al., 2005).

A incorporação de colesterol pela metil- $\beta$ -ciclodextrina mantém maior o percentual de espermatozóides móveis e viáveis após a criopreservação quando comparado a células não tratadas com metil- $\beta$ -ciclodextrina carregada com colesterol (CCC), ou tratadas com outros tipos de ciclodextrinas ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -hidrato,  $\beta$ ,  $\beta$ -hidrato) (COMBES et al., 2000; GRAHAM, 1998; PURDY & GRAHAM, 2004a).

Ciclodextrinas podem ser carregadas com colesterol adicionando as duas substâncias em um diluente aquoso e procedendo a sonicação (ZENG & TERADA, 2000; GALANTINO-HOMER et al., 2006; MOVASSAGHI et al., 2009) ou pela diluição destes numa mistura de metanol : clorofórmio seguida de secagem para obtenção de cristais (PURDY & GRAHAM, 2004a).

Em geral, a metil- $\beta$ -ciclodextrina é mais comumente usada para se tratar espermatozóides antes do congelamento, embora a 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina também seja eficiente para o congelamento de espermatozóides de caprinos (MOCÉ et al., 2010b).

Quando carregadas com colesterol, as ciclodextrinas o transferem abaixo do gradiente de concentração para a membrana plasmática de vários tipos de célula (CHRISTIAN et al., 1997), incluindo o espermatozóide, o que resulta num aumento dos níveis de colesterol na membrana (KLEIN et al., 1995; PURDY & GRAHAM, 2004a; MOORE et al., 2005).

O tratamento dos espermatozóides com CCC aumenta o conteúdo de colesterol de 2 a 3 vezes em bovinos, trutas, caprinos e garanhões (PURDY & GRAHAM, 2004a; MOORE et al., 2005; MÜLLER et al., 2008; MOCÉ et al., 2010b), e este colesterol adicional pode aumentar a relação colesterol : fosfolípidos desses espermatozóides para taxas similares a de espécies não sensíveis ou menos sensíveis ao choque pelo frio (> 0,80). Portanto, o tratamento com CCC pode minimizar os danos sofridos



pelas células espermáticas durante a queda de temperatura na criopreservação.

Muito se discute a respeito do meio diluidor ideal para a veiculação da CCC ao sêmen. Ao relatar estudos preliminares, PURDY & GRAHAM (2004a) citam que quando a incubação foi realizada em meio contendo gema de ovo, não foram observados efeitos benéficos para criopreservação espermática. Segundo estes autores, nestes casos grande parte do colesterol incorporado à ciclodextrina provavelmente é transferido para as gotas de lipídeo da gema de ovo, diminuindo a eficiência da incorporação do colesterol na membrana celular. Desta forma, o que se preconiza são diluidores que não contenham gema de ovo ou leite, que são encontrados na quase totalidade dos diluidores hoje utilizados para criopreservação de sêmen de equídeos.

Estudos recentes têm demonstrado efeitos benéficos da utilização do complexo metil- $\beta$ -ciclodextrina carregada com colesterol na criopreservação de sêmen de asininos, caprinos, bovinos, suínos, ovinos, equinos, camundongos e coelhos com melhora nos parâmetros de motilidade (BARRERA-COMPEAN et al., 2005), viabilidade espermática (COMBES et al., 2000; MOCÉ & GRAHAM, 2006; GALANTINO-HOMMER et al., 2006; AMORIM et al., 2009) e reação acrossômica (MAO et al., 2005).

#### **2.4. Criopreservação de sêmen asinino**

Quanto ao congelamento de sêmen de jumentos os primeiros estudos conduzidos com a espécie no Brasil são de autoria do Dr. Rogério Viera e do Dr. Rubens Paes de Arruda (VIEIRA et al., 1985, ARRUDA et al., 1986), experimentos esses conduzidos na Unidade de Pesquisa Pecuária Sudeste da Embrapa de São Carlos – São Paulo.

Após estes trabalhos iniciais observa-se uma grande lacuna de trabalhos sobre congelamento de sêmen de jumentos no Brasil, vindo

posteriormente os trabalhos de SILVA (1995), PAPA et al. (1999), OLIVEIRA et al. (2006), CANISSO (2008), KER (2010) e OLIVEIRA (2010), sendo que o primeiro e o último não testaram fertilidade.

Apesar da disponibilidade limitada de estudos nos quais existam comparações entre dois ou mais sistemas de envase para sêmen congelado de asininos (SILVA et al. 1997), o uso de palhetas é o mais empregado para este processo em jumentos como atestam VIEIRA et al. (1985), ARRUDA et al. (1986), ARRUDA et al. (1989), TRIMECHE et al. (1996), TRIMECHE et al. (1997), TRIMECHE et al. (1998), PAPA et al. (1999), CANISSO (2008), KER (2010) e OLIVEIRA (2010).

Durante a congelamento, o maior desafio das células espermáticas não é manter-se à temperatura de armazenamento em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), mas sim sua capacidade de suportar mudanças que ocorrem durante zonas intermediárias de temperatura (de  $+19^{\circ}\text{C}$  a  $+8^{\circ}\text{C}$  e de  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-60^{\circ}\text{C}$ ), pela qual elas devem passar duas vezes, durante o congelamento e o descongelamento (MAZUR, 1984).

Fatores como individualidade do animal, o crioprotetor utilizado, diferença entre ejaculados, protocolo adequado e o procedimento de inseminação artificial afetam a fertilidade do sêmen congelado (AMANN & PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996).

#### **2.4.1. Resfriamento do sêmen**

À temperatura corporal, os lipídeos e as proteínas de membrana permanecem em estado de fluidez, onde estes são capazes de se moverem uns entre os outros bilateralmente (AMANN & PICKETT, 1987). No processo de criopreservação, o sêmen deve ser primeiramente resfriado da temperatura corpórea ( $37^{\circ}\text{C}$ ) à temperatura ambiente (cerca de  $20^{\circ}\text{C}$  num laboratório climatizado). Este resfriamento aparentemente não causa danos aos espermatozóides, desde que estes estejam diluídos em meio adequado.

Existe, porém, uma faixa crítica de temperatura no processo de refrigeração, entre +19 e +8°C, em que o espermatozóide pode ser severamente lesado (MORAN, 1992). O resfriamento nesta faixa de temperatura faz com que os lipídios da membrana plasmática passem por uma fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado de gel (GRAHAM, 1996). Neste ponto as cadeias de ácidos graxos que estavam aleatoriamente distribuídas ordenam-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida e tornando essas áreas fracas e suscetíveis a rupturas e a fusões, como também permeáveis a íons (HAMMERSTEDT et al., 1990).

Se esse resfriamento for realizado de maneira inadequada, pode ocorrer um fenômeno chamado choque térmico (WATSON, 1995; WATSON, 2000), que leva a prejuízos irreversíveis como rápida perda de motilidade, movimento circular, redução do metabolismo espermático, danos à membrana plasmática devido aumento da permeabilidade, o que leva à perda de íons e moléculas intracelulares e danos acrossômicos (AMANN & PICKETT, 1987), como edemaciamento e irregularidades do acrossoma (WATSON, 1995).

DOUGLAS-HAMILTON et al. (1984), comparando taxas de resfriamento rápido (maiores que 1 °C/min), médio (entre 1 e 0,33 °C/min) e lento (menores que 0,33 °C/min), concluíram que as taxas lenta e rápida causam maiores danos (maior percentual de patologias, menor motilidade e maior número de células mortas após o resfriamento) à célula espermática do que a taxa média.

#### **2.4.2. Congelamento do sêmen**

Quando o sêmen é resfriado abaixo de 5°C o meio que circunda o espermatozóide e eles próprios sofrem um super-resfriamento (AMANN & PICKETT, 1987). De -6°C a -15°C, a água no meio começa a cristalizar e a concentração de soluto na fração descongelada aumenta, aumentando a pressão osmótica no espaço extracelular (AMANN & PICKETT, 1987; AMANN & GRAHAM, 1993). Neste intervalo a membrana plasmática

impede formação de cristais de gelo intracelular, fazendo com que a água dentro da célula espermática permaneça descongelada (HAFEZ, 1995; GRAHAM, 1996).

Mesmo à temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  ainda existem canais de água descongelada, contendo concentrações de sais extremamente altas. A concentração de sais numa solução salina dita fisiológica (NaCl), que é em torno de 0,15 M em temperatura ambiente, pode aumentar até 2,6 M quando a temperatura é reduzida para  $-10^{\circ}\text{C}$  (MAZUR, 1977). Somente espermatozóides que residem nesses canais sobrevivem à criopreservação (AMANN & PICKETT, 1987). Quando alcançam a temperatura crítica de  $-60^{\circ}\text{C}$  (PARKS & GRAHAM, 1992; HAFEZ, 1995; GRAHAM, 1996), os espermatozóides são relativamente inertes e o sêmen pode ser imerso em nitrogênio líquido, para seu armazenamento (GRAHAM, 1996).

Segundo bases físico-químicas, a lesão celular causada durante os processos de congelamento e descongelamento é devida à formação de cristais de gelo intracelular, que afetam a estrutura da célula. As altas concentrações de sais no meio durante o congelamento podem desidratar o espermatozóide, levando a deformações celulares, danos à estrutura da membrana, deslocamento e desnaturação de proteínas da mesma, e desarranjo de estruturas do citoesqueleto (AMANN & PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996; WATSON, 2000).

Com relação à curva de congelamento, no resfriamento lento ( $-25^{\circ}\text{C}$  a  $-40^{\circ}\text{C/min}$ ), o espermatozóide se desidrata devido à alta concentração de solutos no meio extracelular, e não se formam grandes cristais de gelo intracelulares (AMANN & PICKETT, 1987). Esta desidratação pode resultar em altas concentrações intracelulares de soluto, provocando o chamado efeito solução, prejudicial às células espermáticas (WATSON, 1995).

Por outro lado, numa curva de resfriamento muito rápida ( $> -60^{\circ}\text{C/min}$ ), a água não tem tempo para sair da célula, e em algum ponto

abaixo de  $-10^{\circ}\text{C}$  a célula sofrerá o congelamento interno. A extensão dos danos causados pelo gelo intracelular dependerá do grau de formação de gelo e do tamanho dos cristais. Grandes cristais podem causar danos mecânicos às células, sendo uma das principais causas de morte celular durante o congelamento, enquanto os pequenos cristais podem não ser deletérios. Durante o reaquecimento, porém, o crescimento desses pequenos cristais em decorrência da recristalização pode causar danos severos (MAZUR, 1984).

#### **2.4.3. Descongelamento do sêmen**

A curva de descongelamento é de fundamental importância para minimizar os danos causados aos espermatozóides, e depende da curva de congelamento utilizada. Espermatozóides congelados numa curva lenta requerem uma curva de descongelamento lenta, para permitir o descongelamento dos cristais de gelo extracelulares. O descongelamento desses cristais provoca a diluição dos solutos no meio e lentamente ocorre a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado muito rápido, os cristais extracelulares descongelam-se rapidamente e a água do meio invade bruscamente as células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática (AMANN & PICKETT, 1987; HOLT, 2000).

Já aquelas células congeladas numa curva rápida necessitam de uma curva rápida de descongelamento, de modo que o gelo intracelular que se formou durante o congelamento não tenha tempo para recristalizar-se (AMANN & PICKETT, 1987; PICKETT & AMANN, 1992; GRAHAM, 1996). Dentre os fatores que afetam o descongelamento estão o tipo de envase, espessura da parede da palheta, condutividade de calor da mesma e a temperatura (AMANN & PICKETT, 1987).

Testando diferentes metodologias de descongelamento, VIDAMENT et al. (2001) avaliaram motilidade espermática do sêmen equino descongelado a diversas temperaturas e tempos de descongelamento ( $37^{\circ}\text{C}/30''$ ,  $50^{\circ}\text{C}/10''$ ,  $50^{\circ}\text{C}/20''$ ,  $60^{\circ}\text{C}/10''$ ,  $75^{\circ}\text{C}/5''$ ,

75 °C/10", 75 °C/15"), e não observaram diferenças entre os tratamentos, exceto para o descongelamento a 75 °C/15", cuja motilidade foi zero. FÜRST et al. (2005), avaliando a longevidade do sêmen descongelado a 75 °C/7" e 37 °C/30", observaram que não houve diferença ( $p>0,05$ ) na motilidade espermática.

Para fecundar um ovócito, o espermatozóide precisa apresentar pelo menos quatro atributos pós-descongelamento: metabolismo para a produção de energia; motilidade progressiva; enzimas acrossomais intactas, necessárias para a penetração do espermatozóide através das estruturas que circundam o ovócito; e proteínas de membrana plasmática, importantes para a sobrevivência da célula espermática dentro dos órgãos reprodutivos femininos e para a junção da mesma ao ovócito no momento da fecundação (AMANN & PICKETT, 1987; PICKETT & AMANN, 1992).

## **2.5. Avaliação espermática**

As avaliações *in vitro* do sêmen são de grande importância para se analisar as características relacionadas com a capacidade fecundante do espermatozóide, tais como, motilidade total e progressiva, integridade morfológica, funcionalidade bioquímica da membrana e integridade física da membrana plasmática. JOHNSON et al. (1996) afirmam que o uso de um único teste para avaliar o potencial fecundante do espermatozóide é ilusório, ao passo que a combinação de vários testes oferece maior segurança na estimativa das condições espermáticas.

### **2.5.1. Motilidade espermática**

A avaliação da motilidade espermática é um dos principais recursos para se avaliar os efeitos da criopreservação dos espermatozóides, sendo utilizada em diversos estudos para se obter

comparações entre diluentes, métodos de resfriamento e congelamento e diluições utilizadas.

Sua observação é considerada um elemento importante na avaliação da função espermática (KENNEY et al., 1983; VARNER et al., 1989; PICKETT, 1993). A motilidade é um componente indispensável no mecanismo da fertilização, e sua perda irreversível resulta na perda da função celular. Por outro lado, sua manutenção não implica integridade celular completa (VARNER et al., 1989) e dessa forma não tem correlação absoluta com a fertilidade (PACE & SULLIVAN, 1975; BEDFORD et al., 1995; KELLER, 1998).

Os diluentes de sêmen previnem a aglutinação e reduzem a influência da concentração espermática e do pH seminal sobre a avaliação subjetiva da motilidade (MATTOS, 1995; KELLER, 1998; LAGARES et al., 2000).

O objetivo de se avaliar a motilidade espermática é determinar a porcentagem de espermatozóides que estão móveis dentro de um ejaculado. A motilidade total é definida como a porcentagem de espermatozóides que apresenta movimento circular, pendular, progressivo ou em serpentina.

Para se obter uma avaliação mais confiável, pode se avaliar também a porcentagem de espermatozóides com motilidade progressiva, pois estes estão relacionados com altos índices de fertilidade (PICKET & VOSS, 1972). Entende-se por motilidade progressiva a porcentagem de células que estão se movimentando ativamente para frente. Incluem-se, também, os espermatozóides com movimentos circulares amplos, devido à alta incidência de implantações abaxiais do colo (BIELANSKI & KACZMARSKI, 1979).

O número de espermatozóides com motilidade é utilizado para determinar a dose inseminante e maximizar a eficiência reprodutiva de garanhões em programas de inseminação artificial (PICKET & VOSS, 1972).

### **2.5.2. Funcionalidade da membrana plasmática**

A integridade funcional da membrana plasmática da célula espermática é de relevância para que haja o desencadeamento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na fecundação (capacitação, reação acrossômica, fusão do espermatozóide com ovócito) (MAFFILI et al., 2003; SIQUEIRA et al., 2007), e para a manutenção e sobrevivência espermática nos órgãos reprodutivos femininos (SQUIRES et al., 1999).

O teste hiposmótico (hipoosmotic swelling test - HOST) foi inicialmente utilizado para avaliar a função da membrana plasmática e a capacidade de fertilização do espermatozóide humano (JEYENDRAN et al., 1984), e tem sido utilizado para a avaliação espermática em bovinos (CORREA & ZAVOS, 1994; REVELL & MRODE, 1994), suínos (VASQUEZ et al., 1997; ZOU & YANG, 2000) equinos (VIDAMENT et al., 1998; NEILD et al., 1999; MELO, 1999), caninos (KUMI-DIAKA, 1993), asininos (TRIMECHE et al., 1996; TRIMECHE et al., 1998; SERRES et al., 2002; ÁLVAREZ et al., 2006; CANISSO et al., 2008a) e caprinos (FONSECA et al., 2005)

O teste hiposmótico avalia se as membranas espermáticas estão funcionais. As membranas biológicas são responsáveis pela homeostase celular, por meio das trocas realizadas com o meio externo. A membrana forma uma barreira semipermeável para moléculas e serve para manter e modular a composição do meio intracelular. Além disso, a membrana protege a célula contra as influências do ambiente extracelular, tanto nos órgãos reprodutivos masculino (até os espermatozóides serem ejaculados) como no feminino (até ocorrer à fertilização). Protege também de influências não fisiológicas, quando os espermatozóides são colocados nos diluentes seminais (EINARSSON, 1992).

Os espermatozóides íntegros mantêm um equilíbrio osmótico com o ambiente em que se encontram. Quando os espermatozóides são expostos a soluções hipotônicas, aqueles com membrana funcional sofrem aumento de tamanho, no intuito de estabilizar o equilíbrio



osmótico, produzindo um inchaço típico na região da cauda e, conseqüentemente, alterações na morfologia espermática. Ao sofrerem o choque osmótico, os espermatozóides tendem a promover um dobramento/enrolamento de cauda, indicando que possuíam membranas íntegras antes do teste (DREVIUS & ERIKSSON, 1966; JEYENDRAN et al., 1992; DELL'AQUA Jr. et al., 2002).

MELO (1999), com o intuito de determinar o teste hiposmótico ideal para a espécie equina, verificou que, independentemente do soluto, as soluções com 150 mOsmol/Kg ou menos demonstraram melhores respostas ao teste hiposmótico.

CANISSO (2008) utilizou o HOST para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática após a criopreservação do sêmen de jumentos da raça Pêga em dois diluidores de congelamento, de MARTIN et al. (1979) e de NAGASE & NIWA (1964). Para tal, utilizou metodologia descrita por MELO (1999), não observando diferenças quanto à reatividade ao teste (42,5 % e 42,6%) para os dois diluidores. OLIVEIRA (2010), usando a mesma metodologia, encontrou  $17,8 \pm 9,1$  e  $32,6 \pm 12,7$  células reativas para sêmen asinino congelado sem adição de colesterol e com adição de 1 mg de CCC/120 x  $10^6$  de espermatozóides ( $p < 0,05$ ).

### **2.5.3. Integridade física da membrana**

O primeiro teste desenvolvido para avaliação da integridade da membrana plasmática foi o supravital, também conhecido como teste dos vivos e mortos. Esse teste consiste na utilização de corantes derivados da fluoresceína, sendo a eosina o mais utilizado (FÜRST, 2005; KER, 2010), podendo ser adicionada a um corante de fundo, como a nigrosina.

Assim como os demais testes de integridade de membrana, se baseia no fato de que a membrana plasmática íntegra pode prevenir a entrada do corante no citoplasma celular. A eosina penetra pela membrana lesionada dos espermatozóides e cora o interior do núcleo em

vermelho, possibilitando identificar os espermatozóides mortos. Esta é uma técnica rápida, de fácil uso e que dispensa o uso de microscópio especial.

MELO (1999) utilizando a técnica de coloração de eosina-nigrosina em sêmen equino resfriado com diferentes meios diluidores, verificou uma alta correlação ( $r=0,75$ ) entre a porcentagem de vivos (não corados) e a motilidade espermática total.

OLIVEIRA (2010), trabalhando com eosina amarela 0,5%, obteve  $32,5 \pm 13,1$  e  $49,9 \pm 12,5$  ( $p<0,05$ ) de células espermáticas vivas após descongelamento do sêmen de jumentos da raça Pêga sem adição de colesterol e com adição de 1 mg de CCC/120 x  $10^6$  de espermatozóides, respectivamente.

#### **2.5.4. Morfologia espermática**

Ao longo dos anos, tentativas foram feitas no intuito de quantificar as alterações morfológicas e tentar estabelecer sua relação com a fertilidade nos animais, sendo a espécie bovina a com maior número de trabalhos desenvolvidos, devido ao grande interesse econômico. BLOM (1950) propôs uma classificação dos defeitos espermáticos em primários e secundários, de forma que os primeiros seriam gerados durante a espermatogênese, e os últimos durante a maturação. DOTT (1975), trabalhando com sêmen de garanhão, acrescentou nesta classificação anormalidades terciárias (artefato de técnica), ou seja, geradas por danos induzidos ao espermatozóide durante a manipulação pós coleta.

Porém RAO (1971), ao trabalhar com touros normais e com problemas clínicos reprodutivos, não conseguiu enquadrar as alterações morfológicas encontradas no sêmen desses touros na classificação de defeitos primários e secundários, o que levou à contestação da classificação feita por BLOM (1950). Então BLOM (1973) refez sua classificação original e agrupou as alterações em defeitos maiores e

defeitos menores, sendo a alteração morfológica classificada de acordo com o potencial de seu efeito sobre a fertilidade de touros.

Aparentemente, os trabalhos de NISHIKAWA et al. (1952) e NISHIKAWA (1959) foram os primeiros estudos desenvolvidos com objetivos de realizar comparações entre as características da morfologia espermática entre garanhões e jumentos. Estes autores observaram que os espermatozóides asininos se assemelham ao dos garanhões, entretanto, com a cauda mais longa e a cabeça de formato ligeiramente mais globoso, semelhante ao espermatozóide do touro e carneiro. A morfologia espermática de equídeos apresenta similaridade com as demais espécies de animais, porém, a cabeça do espermatozóide é assimétrica e a inserção abaxial da cauda é considerada normal, além de acrossomo relativamente pouco desenvolvido (MAGISTRINI, 2000).

NISHIKAWA (1959), na avaliação de sêmen de jumentos e de garanhão, classificou as alterações morfológicas de acordo com seu local de alteração: cabeça, peça intermediária e cauda. Mas no Brasil, conforme as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), na avaliação andrológica, reprodutores de todas as espécies devem ser avaliados quanto à morfologia espermática baseando-se na classificação de BLOM (1973), ou seja, em defeitos maiores, menores e totais.

#### **2.5.5. Longevidade espermática**

Os parâmetros avaliados no Teste de Termorresistência (TTR) são motilidade espermática e vigor espermático, com as avaliações começando no tempo zero (momento em que o sêmen é descongelado) e sendo realizadas em intervalos de 30 minutos, por períodos que variam de 90 (COCHRAN et al., 1984; KER, 2010), 120 (OLIVEIRA, 2010), 180 (MATTOS et al., 1993) a 240 minutos (CBRA, 1998).

Os resultados do TTR são influenciados por vários fatores, dentre eles: o efeito do ejaculado, método de congelamento e efeito do tempo e temperatura de incubação, sendo esta última a variável mais importante para o sêmen equino (FÜRST, 2006). Para sêmen asinino tem se utilizado incubação do sêmen a uma temperatura de 37 °C (KER, 2010 e OLIVEIRA, 2010).

## **2.6. Dose inseminante, local de deposição e fertilidade do sêmen congelado**

Para se alcançar melhores taxas de gestação quando se utiliza o sêmen congelado ainda são necessários o aperfeiçoamento e a padronização da técnica de criopreservação para maximizar esta biotecnologia. Dentre alguns fatores podem ser destacados: momento da inseminação, local de deposição do sêmen, dose inseminante, qualidade e padronização do sêmen congelado.

AMANN & PICKETT (1987) registraram baixa taxa de fertilidade/ciclo estral quando da utilização do sêmen congelado, mesmo quando as doses inseminantes tiveram concentração adequada de espermatozóides com motilidade progressiva.

O número de células espermáticas por dose inseminante, em equinos, é controverso, possivelmente em decorrência de diferentes protocolos utilizados, como o uso de diferentes diluidores, o momento de inseminação, a qualidade seminal, dentre outros.

SAMPER et al. (1998), em um levantamento realizado em 25 laboratórios do mundo todo, verificaram valores variando de 250 a 700 x 10<sup>6</sup> de células por dose. DELL'AQUA Jr. (2000), utilizando doses inseminantes de 50, 100, 300 e 800 x 10<sup>6</sup> de células viáveis, não obteve diferenças significativas para taxa de prenhez em éguas.

TRIMECHE et al. (1998) utilizaram sêmen congelado de jumento com 600 x 10<sup>6</sup> de células móveis em jumentas Poitou, e alcançaram taxa

de gestação de 38%. PAPA et al. (1999), trabalhando com sêmen de jumentos na dose de  $800 \times 10^6$ , obtiveram 66% de éguas gestantes (Tabela 1).

A forma de inseminação vem demonstrando ser uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva em programas comerciais de inseminação artificial com sêmen congelado. MORRIS et al. (2000) e ZAHN et al. (2002) realizaram inseminações pelo método convencional, depositando de 200 a 500, e 800 milhões de espermatozóide viáveis no corpo do útero, respectivamente.

Já outros autores optaram pela deposição do sêmen no ápice do corno ipsilateral à ovulação, próximo à junção útero-tubárica, por meio de pipeta flexível guiada através da cérvix e corno uterino (FLEURY & CASSOLI, 1999; CANISSO, 2008; KER, 2010).

Técnicas mais sofisticadas e onerosas como a endoscopia vêm sendo empregadas na inseminação artificial em equinos com êxito como alternativa no uso racional de sêmen de garanhões subfêrteis ou com baixa congelabilidade (MORRIS et al., 2000). Uma das grandes vantagens desse método parece ser a utilização de reduzido número de espermatozoides por dose inseminante (até  $5 \times 10^6$  espermatozoides). Essa técnica consiste no uso de um endoscópio, que auxilia na deposição do sêmen na papila útero-tubária ipsilateral ao folículo ovulatório (MORRIS et al., 2000; ALVARENGA et al., 2002; LINDSEY et al., 2002), mas ainda tem uso restrito a experimentos ou situações extremas.

FEO (1994), na primeira fase do seu experimento, utilizando éguas de matadouro, inseminou-as no corpo e corno ipsilateral ao folículo dominante, 1 a 2 horas antes do seu sacrifício. Recolheu as tubas uterinas, cornos uterinos e cérvix, e após lavagem com ringer lactato, contou os espermatozoides recuperados de cada segmento e verificou que a IA intracornual propiciou um número significativamente maior de células no corno uterino correspondente, quando comparado a IA no corpo do útero. Na fase de campo, utilizando os dois métodos, foram

inseminadas 73 fêmeas, com expressiva vantagem ( $p < 0,0001$ ) para as gestações obtidas através da IA intracornual (66% - 48/32) em oposição a no corpo uterino (32% - 8/25).

NIE et al. (2000) inseminando trinta éguas no ápice do corno ipsilateral ao folículo dominante com uma pipeta flexível e uma dose de  $1 \times 10^6$  de espermatozóides, obtiveram taxa de fertilização de 25,9 % e concluíram que o uso da dose inseminante mais concentrada, depositada na JUT, poderia tornar mais eficiente o uso do garanhão do que uma dose de  $500 \times 10^6$  de células viáveis depositada no corpo uterino.

Além disso, sabe-se que o sêmen congelado equino tem menor habilidade em interagir com as células da tuba uterina, mantendo sua viabilidade por menos tempo. Em decorrência disso indica-se que a inseminação seja feita de 0 a 24 horas antes da ovulação ou até 6 horas após a ovulação (SQUIRES et al., 1999).

KER (2010) e CANISSO (2008), utilizando dose inseminante de  $300 \times 10^6$  de espermatozóides móveis, alcançaram taxas de prenhez satisfatórias em éguas ao utilizarem sêmen de jumento congelado em inseminações no ápice do corno ipsilateral à ovulação. As taxas foram 40% e 52%, respectivamente.

Os baixos resultados de fertilidade obtidos para o sêmen congelado de jumentos na inseminação de éguas, e principalmente, na inseminação de jumentas, têm incentivado pesquisas na área. Melhores resultados poderiam em alguns casos garantir a preservação de algumas raças (TRIMECHE et al., 1998) e em outros viabilizar economicamente a utilização desta biotécnica para a espécie (LAGARES et al., 2008; KER, 2010). Alguns dos resultados de fertilidade para o sêmen asinino criopreservado encontram-se sumariados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Taxa de gestação de éguas e jumentas inseminadas com sêmen congelado de jumento após a ovulação.

Taxa de prenhez por ciclo	Fêmea inseminada	Momento da Inseminação	Dose inseminante (x 10 <sup>6</sup> spz móveis)	Pesquisador
33% (6/20)	éguas	Pós ov.	250	VIEIRA et al. (1985)
44% (6/14)	éguas	Pós ov.	250	ARRUDA et al. (1986)
66% (2/3)	éguas	Pós ov.	800	PAPA et al. (1999)
40% (4/10)	éguas	Pós ov.	800	OLIVEIRA et al. (2006)
52% (31/60)	éguas	Pós ov.	300	CANISSO (2008)
36% (18/50)	éguas	Pós ov.	400	VIDAMENT et al. (2009)
40% (10/25)	éguas	Pós ov.	300	KER (2010)
21% (8/38)	jumentas	Pós ov.	600	TRIMECHE et al. (1998)
0% (0/53)	jumentas	Pós ov.	800	OLIVEIRA et al. (2006)
11% (4/38)	jumentas	Pós ov.	400	VIDAMENT et al. (2009)

## 2.7. Efeito do tratamento com Ciclodextrina Carregada com Colesterol (CCC) na qualidade do sêmen descongelado

De forma geral, o tratamento com CCC antes do congelamento de sêmen aumenta a motilidade total e/ou integridade de membrana. Esse benefício pode ser em pequena escala, com melhoria em poucos pontos percentuais, ou considerável, em torno de 25%. A maioria dos estudos reporta taxas de aumento de 10 a 20% (Tabela 2). No entanto, o benefício do tratamento com CCC varia para espermatozóides de diferentes espécies, diferentes linhagens dentro de uma mesma espécie, de indivíduo para indivíduo e espermatozóides tratados de diferentes maneiras (sêmen sexado, por exemplo).

Tem se notado que o tratamento com CCC beneficia o sêmen de espécies cujos espermatozóides são sensíveis ao choque pelo frio, mas o mesmo não parece ter nenhum efeito em espécies cujos espermatozóides não são sensíveis ao choque pelo frio, como coelho e truta arco-íris. Esta falta de benefício pode ser esperada, pois o coelho já apresenta naturalmente uma alta relação colesterol : fosfolípidos (0,88; WATSON, 1981), sendo improvável que o tratamento com CCC possa aumentar o teor de colesterol dos espermatozóides de forma significativa.

Além da diferença na forma como os espermatozóides de diferentes espécies são afetadas pelo tratamento com CCC, há também uma variação entre indivíduos e linhagens dentro de uma mesma espécie. Por exemplo, os espermatozóides de garanhões que normalmente não congelam bem (classificados como "maus congeladores") se beneficiam mais quando tratados com CCC do que espermatozóides de garanhões que normalmente congelam bem ("bons congeladores") (MOORE et al. 2005).

É importante ressaltar que os efeitos benéficos observados após criopreservação são devidos ao aumento do teor de colesterol celular e não às ciclodextrinas por si só, uma vez que o espermatozóide tratado apenas com ciclodextrinas antes da criopreservação (com intuito de remover o colesterol das células) tende a diminuir as taxas de sobrevivência de células espermáticas de carneiro após descongelamento (MOCÉ et al. 2010). Por outro lado, os espermatozóides de coelho e truta arco-íris tratados apenas com ciclodextrina apresentaram taxas semelhantes de sobrevivência aos não tratados após descongelamento (MOCÉ & GRAHAM, 2005; MÜLLER et al., 2008) (Tabela 2). Isso pode ser devido à retirada de colesterol da membrana espermática destas espécies não ser tão intensa ao ponto de prejudicar a habilidade da célula em resistir ao choque pelo frio.

OLIVEIRA (2010), trabalhando com diferentes níveis de incorporação de CCC ao sêmen de jumentos Pêga antes da criopreservação (0 mg, 1 mg, 2 mg, e 3 mg), chegou a conclusão de que todos os tratamentos foram superiores ao sêmen não tratado após as avaliações *in vitro* (teste com IP/FITC-PNA, motilidade computadorizada, HOST, morfologia espermática e supravital), sendo o tratamento com 1 mg o mais viável economicamente, uma vez que não houve diferença entre os tratamentos.



**Tabela 2:** Concentrações de CCC utilizadas para tratamento de espermatozóides e qualidade espermática observada após descongelamento para algumas espécies.

Espécies	Autores	Concentração	Motilidade total (%)		Integridade de membrana (%)	
			Contr.	+ Col.	Contr.	+ Col.
<b>Bovino</b>	Purdy & Graham (2004a)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	42	60	46	55
	Purdy et al. (2005)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	-	-	60	76
	Mocé & Graham (2006)	2 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	58	58	45	62
	Amorim et al. (2009)	1,5 mg / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	40	54	30	50
	Moraes et al. (2010)	1,5 mg / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	32	56		
<b>Equino</b>	Combes et al. (2000)	0,125 mmol colesterol / L	43-52	63-67	35,8-39,7	53,2-60,5
	Zahn et al. (2002)	0,125 mM	69	67	44	49
	Moore et al. (2005)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	62	72	47	56
	Spizziri et al. (2010a)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	37	51	-	-
	Oliveira et al. (2010)	1,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	Motilidade similar		20	34
<b>Asinino</b>	Álvarez et al. (2006)	2 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	30	45	23 (MAI)	31 (MAI)
	Oliveira (2010)	1 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	64,2	74,8	17,7 (MAI)	34,4 (MAI)
		2 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	64,2	80,0	17,7 (MAI)	31,8 (MAI)
		3 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	64,2	81,1	17,7 (MAI)	36,1 (MAI)
<b>Ovino</b>	Barrera-Compean et al. (2005)	2,5 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	42	52	53	57
	Tomás et al. (2008)	1 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	42	48	40	49
<b>Caprino</b>	de Graaf et al. (2007) (Sêmen sexado)	1,8 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	80	70	-	-
	Mocé et al. (2010)	2 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	28	45-46	24	45-47
	Purdy et al. (2010)	2 mg CCC / 120 x 10 <sup>6</sup> sptz	36	38	41	49

<b>Suíno</b>	Zeng & Terada (2000)	20 mM HBC+5 mM col. a $500 \times 10^6$ sptz/mL	35	52	8	13
	Zeng & Terada (2001)	20 mM MBC+10 mM col. a $500 \times 10^6$ sptz/ mL	31	31	-	-
	Torres et al. (2009)	1,5 mg CCC / $120 \times 10^6$ sptz	37	46	-	-
	Torres et al. (2009b)	1 mg CCC / $120 \times 10^6$ sptz	57	63	-	-
<b>Camundongo</b>	Loomis & Graham (2008)	2 mg CCC / $120 \times 10^6$ sptz	9-52	38-55	-	-
	Movassaghi et al. (2009)	1–2 mg CCC sonicada / mL (concentração desconhecida)	29	66-71	-	-
<b>Coelho</b>	Mocé & Graham (2005)	5 mg CCC / $120 \times 10^6$ sptz	14	17	33	31
<b>Truta</b>	Müller et al. (2008)	0,4 $\mu$ mol col. (5 $\mu$ mol MBC / $10^9$ sptz)	3-15	3-15	-	-

Contr.:sêmen não tratado com ciclodextrina carregada com colesterol (CCC). + Col.: sêmen tratado com CCC antes do congelamento. MIAI: membrana plasmática íntegra e acrossomo íntegro. HBC: 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. MBC: metil- $\beta$ -ciclodextrina. Sptz: espermatozóides. (Adaptado de MOCÉ et al., 2010a).

## **2.8. Efeito da Ciclodextrina Carregada com Colesterol na capacidade de fertilização do espermatozóide**

Na Tabela 3 está sumarizada a capacidade de fertilização dos espermatozóides tratados com CCC quando utilizados ensaios *in vitro*. Na maioria dos estudos, os espermatozóides tratados com CCC apresentaram maior taxa de penetração de ovócitos e/ou maior número de espermatozóides ligados à zona pelúcida ou membranas perivitelínicas da gema de ovo.

Discute-se entre os pesquisadores a maneira como se deve testar a eficiência da adição de colesterol à membrana plasmática. MOORE et al. (2005), utilizando mesmo número de espermatozóides totais para realizar o ensaio (fixando-se o número de palhetas e favorecendo aquele tratamento com melhor motilidade e viabilidade), relataram que os espermatozóides de equinos tratados com CCC apresentaram maior capacidade fecundante. O mesmo resultado foi encontrado por TOMÁS et al. (2009b) quando a motilidade e viabilidade foram semelhantes entre o grupo tratado ou não para realização dos ensaios com sêmen de caprino.

Outros estudos, porém, relatam taxas similares de fertilização *in vitro* (PURDY & GRAHAM 2004b) e ligação à zona pelúcida (SPIZZIRI et al. 2010a) para espermatozóides tratados e não tratados, quando mesmo número de espermatozóides móveis foi utilizado no ensaio para ambos os grupos.

Resultados para testes de fertilidade *in vivo* estão resumidos na Tabela 4. Embora a qualidade do sêmen em geral seja melhor para os espermatozóides tratados com CCC após a criopreservação, isto não tem se traduzido em uma maior capacidade de fertilização *in vivo*. Embora taxas de fertilidade mais baixas de espermatozóides tratados com CCC em relação ao controle tenham sido relatadas em garanhões (ZAHN et al. 2002), na maioria dos estudos o sêmen tratado com CCC e o controle têm mostrado taxas de fertilidade semelhantes (em truta arco-íris,

carneiros e garanhões; MÜLLER et al. 2008; PURDY & GRAHAM, 2004b; PURDY et al. 2010; SPIZZIRI et al. 2010a).

**Tabela 3:** Efeito da ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) na fertilidade *in vitro*.

Espécies	Teste	Parâmetro Avaliado	Controle	Tratado CCC	Tratado Ciclo
<b>Bovino</b> <sup>ab</sup>	MPVGO	Nº sptz ligados/MPVGO	62 <sup>a</sup>	115 <sup>a</sup>	-
			85 <sup>b</sup>	157 <sup>b</sup>	-
<b>Bovino</b> <sup>c</sup>	FIV-bov	Clivagem	48%	46%	-
		Blastocistos/ovócito clivado	25%	26%	-
<b>Equino</b> <sup>de</sup>	ELZP-bov	Nº sptz ligados/ZP	15 <sup>d</sup>	48 <sup>d</sup>	-
			13,4 <sup>e</sup>	21 <sup>e</sup>	-
		Nº sptz ligados à ZP/	0,23 <sup>d</sup>	0,64 <sup>d</sup>	-
		motilidade espermática	13,4 <sup>e</sup>	21 <sup>e</sup>	-
<b>Caprino</b> <sup>f</sup>	ELZP-bov	Nº sptz ligados/ZPb	4,6	12	-
	ELZP-ovi	Nº sptz ligados/ZPo	9,3	27,3	-
<b>Suíno</b> <sup>g</sup>	FIV-suíno	Taxa de penetração	1,8%	-	46,3%
<b>Suíno</b> <sup>h</sup>	EPE-suíno	Ovócitos penetrados	51,47%	69,27%	52,66%
		Nº sptz/ovócito penetrado	3,35	4,97	3,66

Controle: sêmen sem adição de colesterol; Tratado CCC: sêmen tratado com ciclodextrina carregada com colesterol; Tratado Ciclo: espermatozóides tratados com ciclodextrina; MPVGO: membrana perivitelínica da gema de ovo de galinha; FIV-bov: fertilização *in vitro* de ovócitos bovinos maturados *in vitro*; ELZP-bov: ensaio de ligação à zona pelúcida de ovócitos bovinos imaturos; ELZP-ovi: ensaio de ligação à zona pelúcida de ovócitos ovinos imaturos; ZPb: zona pelúcida bovina; ZPo: zona pelúcida ovina; FIV-suíno: fertilização *in vitro* de ovócitos suínos maturados *in vitro*; EPE-suíno: ensaio de penetração espermática em ovócitos imaturos de suínos. Sptz: espermatozóides.

<sup>a</sup> AMORIM et al. (2009); <sup>b</sup> MORAES et al. (2010); <sup>c</sup> PURDY & GRAHAM (2004b); <sup>d</sup> MOORE et al. (2005); <sup>e</sup> SPIZZIRI et al. (2010a); <sup>f</sup> MOCÉ et al. (2010b); <sup>g</sup> MAO et al. (2005); <sup>h</sup> TOMÁS et al. (2009b). (Adaptado de MOCÉ et al., 2010a).

**Tabela 4:** Efeito do tratamento do sêmen com CCC sobre a fertilidade dos espermatozoides *in vivo*.

Espécies	Dose Inseminate	Controle	Tratado CCC	Tratado Ciclo
<b>Bovino</b> <sup>a</sup>	750.000 sptz totais/IA	50% (16/32)	59% (19/32)	-
<b>Equino</b> <sup>b</sup>	800 x 10 <sup>6</sup> sptz móveis/IA	75% (9/12)	25% (3/12)	-
<b>Equino</b> <sup>c</sup>	400 x 10 <sup>6</sup> sptz totais/IA	28,6% (6/21)	15% (3/20)	-
<b>Truta</b> <sup>d</sup>	1 x 10 <sup>9</sup> sptz/200 ovos	>40%	>40%	≈ 20%
<b>Caprino</b> <sup>e</sup>	100 x 10 <sup>6</sup> sptz totais/IA	45,3% (13/29)	41% (15/36)	-

Controle: sêmen sem adição de colesterol; Tratado CCC: sêmen tratado com ciclodextrina carregada com colesterol; Tratado Ciclo: espermatozoides tratados com ciclodextrina. Sptz: espermatozoides.

<sup>a</sup> PURDY & GRAHAM (2004b); <sup>b</sup> ZAHN et al. (2002); <sup>c</sup> SPIZZIRI et al. (2010a); <sup>d</sup> MÜLLER et al. (2008); <sup>e</sup> PURDY et al. (2010). (Adaptado de MOCÉ et al., 2010a).

Percebe-se que pouco ainda se sabe sobre a capacidade de fertilização *in vivo* do sêmen criopreservado com adição de colesterol, sendo que apenas cinco trabalhos testaram até o momento a capacidade fertilizante deste sêmen em animais (Tabela 4). É inexistente ainda este teste para o sêmen asinino congelado com adição de CCC.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Esta dissertação foi resultado de dois experimentos. O experimento 1 foi realizado durante a estação de monta 2009-2010 e o experimento 2 durante a estação de monta 2010-2011.

#### **3.1. Experimento 1**

Foi realizado durante os meses de novembro de 2009 a fevereiro de 2010, no Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa – MG, latitude 20°45'14''sul e longitude 42°52'55''oeste; e em um haras privado de produção comercial de muares e asininos, localizado no município de Guaraciaba – MG, latitude 20°34'15'' sul e longitude 43°00'28'' oeste.

##### **3.1.1. Manejo dos animais**

Como doadores de sêmen foram utilizados dois jumentos da raça Pêga (J1 e J2) com cinco anos de idade. Antes do início do período experimental os animais foram submetidos ao processo de esgotamento das reservas espermáticas extragonadaís, realizando-se uma coleta diária durante sete dias. Ambos se apresentaram comprovadamente férteis, conforme exame andrológico e histórico reprodutivo.

Os animais foram mantidos em baias e soltos durante três a seis horas por dia. Os jumentos receberam volumoso a base de capim napier picado (*Pennisetum purpureum*) e concentrado farelado, nas quantidades que atendem as exigências nutricionais da categoria para manutenção (NRC, 2007). Sal mineral e água de boa qualidade foram fornecidos à vontade.

Para realização das inseminações foram utilizadas 30 éguas mestiças com grau de sangue predominante da raça Bretã, entre éguas solteiras, paridas e potras, pertencentes ao setor de Equideocultura do DZO/UFV, com histórico reprodutivo conhecido e idade variando entre 2 e

18 anos (9 anos de média). As éguas foram mantidas a pasto e receberam capim napier picado (*Pennisetum purpureum*) e concentrado farelado, nas quantidades que atenderam as exigências nutricionais da categoria para manutenção (NRC, 2007). Sal mineral e água de qualidade foram fornecidos à vontade.

### **3.1.2. Coleta de sêmen**

O sêmen foi coletado em intervalos de 48-72 horas, utilizando vagina artificial (modelo Hannover), devidamente preparada com água à temperatura entre 45 e 50 °C. As coletas de sêmen do J1 foram realizadas entre os dias 02/11/2009 e 07/12/2009, e as coletas do J2 do dia 21/12/2009 ao dia 28/01/2010. Para as coletas de J1 se utilizou jumenta como manequim contida por peias, e para as coletas de J2 se utilizou égua contida em tronco.

Após a coleta, foram avaliados a motilidade espermática total (0-100%), o vigor espermático (0-5), a concentração (câmara de Neubauer, após diluição de uma parte de sêmen para noventa e nove partes de água destilada), a morfologia espermática e reação ao teste hiposmótico e ao teste de coloração supravital.

### **3.1.3. Preparo da solução de Ciclodextrina Carregada com Colesterol (CCC)**

Metil- $\beta$ -ciclodextrina foi carregada com colesterol adotando a metodologia descrita por PURDY & GRAHAM (2004a). Onde, 200 mg de colesterol (C3045; Sigma) foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio (Synth) em um tubo de vidro. Em um becker foi dissolvido 1 g de metil- $\beta$ -ciclodextrina (C4555; Sigma) em 2 mL de metanol (Ecibra). Em seguida, uma alíquota de 0,45 mL da solução de colesterol-clorofórmio foi adicionada à solução de ciclodextrina, e a mistura agitada até ficar branca. Depois, a mistura foi colocada em uma placa de Petri de vidro e os solventes foram removidos por evaporação usando placa aquecedora

a temperatura de 37 °C por um período de 48 horas. Os cristais resultantes foram removidos da placa por raspagem, com auxílio de uma espátula, e estocados em tubos de vidro a temperatura ambiente.

A solução de trabalho de CCC neste experimento foi preparada pela adição de 50 mg de cristais de CCC em 1 mL de diluidor STALP (MOORE et al., 2005) (Anexo 7.1) a 37 °C e homogeneizada por agitação com auxílio de um agitador vortex. Esta solução foi mantida congelada a -80 °C até sua utilização, quando foi aquecida a 37 °C e homogeneizada antes da incubação com sêmen.

#### **3.1.4. Processamento do sêmen e tratamento com CCC**

Após avaliação o sêmen foi diluído com diluidor STALP (MOORE et al., 2005) para concentração de 120 milhões de espermatozóides por mililitro. Oitenta mililitros deste sêmen foram distribuídos em oito tubos cônicos de centrífuga de 15 mL, sendo cada tubo preenchido com 10 mL.

A quatro tubos contendo o sêmen diluído foi adicionado 1 mg de CCC/120 x 10<sup>6</sup> espermatozóides (OLIVEIRA, 2010), o que corresponde a 200 µL da solução de trabalho de CCC por tubo (Tratamento 1 – T1). O sêmen dos outros quatro tubos não recebeu adição de CCC (Tratamento 2 – T2). As amostras foram então incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos, sendo colocadas dentro de uma caixa de isopor para proteção contra luz.

Após o período de incubação, o sêmen foi centrifugado a 600 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com uma seringa de 20 mL acoplada a uma palheta de 0,5 mL por uma ponteira de 100 µL, e o pellet de cada tubo foi ressuspensionado com 2 mL de diluente lactose-EDTA contendo 5% de glicerol (MARTIN et al., 1979) (Anexo 7.2).

Após a ressuspensão, o conteúdo dos quatro tubos de cada tratamento foi reunido num único tubo para determinação da concentração espermática. Quantidade do mesmo diluidor foi então



adicionada para se obter uma concentração final de 200 milhões de espermatozoides/mL.

### 3.1.5. Congelamento do sêmen

Feita a ressuspensão o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL. As palhetas foram resfriadas seguindo metodologia descrita por FÜRST et al. (2005), onde foram colocadas em um tubo de ensaio de 20 mL com tampa, em temperatura ambiente. Em seguida, o tubo de ensaio foi revestido por um saco plástico e inserido dentro de um recipiente de plástico (mamadeira) de 240 mL contendo 120 mL de álcool absoluto (Figura 2). O recipiente foi colocado na posição horizontal dentro de uma geladeira de 280 L, com temperatura interna de 4-5 °C, de forma a produzir taxa média de resfriamento de -0,5 °C por minuto em um tempo de resfriamento 35 minutos. Em seguida o sêmen foi mantido por mais 25 minutos a temperatura de 4-5 °C.



**Figura 2:** Recipiente utilizado para o resfriamento do sêmen. Cada tubo suporta até 10 palhetas de 0,5 mL. Temperatura interna da geladeira sempre mensurada com auxílio de um termômetro digital.

Após o resfriamento uma palheta de cada tratamento foi retirada para avaliação da motilidade total, vigor, HOST, morfologia e coloração supravital.

As palhetas restantes foram distribuídas sobre rampa flutuante (Figura 3) com 4 cm de altura e mantidas no vapor de nitrogênio por 15 minutos (-60 °C/min; COCHRAN et al., 1984). Em seguida foram

mergulhadas no nitrogênio líquido e então armazenadas em botijão criogênico (-196 °C).



**Figura 3:** Rampa metálica flutuante com 4 cm de altura utilizada para congelamento do sêmen. Capacidade para 80 palhetas de 0,5 mL.

#### **3.1.6. Descongelamento do sêmen**

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37 °C por 30 segundos (CBRA, 1998) para posteriores análises e inseminações.

#### **3.1.7. Testes *in vitro* para avaliar a viabilidade espermática do sêmen descongelado**

##### **3.1.7.1. Avaliação subjetiva da motilidade espermática**

Uma palheta do tratamento 1 e uma do tratamento 2 foram descongeladas e o sêmen depositado e mantido em tubos plásticos de 1,5 mL em banho-maria a 37 °C. Seis microlitros de cada amostra foram colocados sobre lâmina e sob lamínula para avaliação da motilidade espermática total (0-100%) e vigor espermático (0-5) pelo método de duplo cego (dois avaliadores). Todo material que entrou em contato com o sêmen estava aquecido a 37 °C. As leituras foram realizadas em microscopia de contraste de fase com objetiva de 400x.

##### **3.1.7.2. Teste Hiposmótico (HOST)**

Foram diluídos 100 µL de sêmen em 1 mL de solução de sacarose 100 mOsmol/Kg (Anexo 7.3) aquecida em banho-maria a 37 °C. Os tubos

de 1,5 mL contendo a mistura foram incubados por 60 minutos na mesma temperatura e posteriormente fixados com 0,5 mL de solução de formol salino (HANCOCK, 1957) para futura leitura.

As células foram classificadas pela presença ou ausência de cauda enrolada, segundo padrões descritos por NEILD et al. (1999). O cálculo da reação hiposmótica foi realizado por meio da seguinte fórmula:  $HOST = (\% \text{ de caudas enroladas após o HOST}) - (\% \text{ de caudas enroladas antes do HOST})$  conforme descrito por MELO & HENRY (1999).

#### **3.1.7.3. Coloração supravital (vivos e mortos)**

A coloração supravital foi realizada utilizando o corante eosina amarela a 0,5% (Newprov<sup>®</sup>). Uma gota do corante foi colocada sobre uma lâmina para que se aquecesse a 37 °C antes de entrar em contato com o sêmen a ser avaliado. Amostra de 10 µL do sêmen foi depositada sobre uma lâmina e posteriormente 10 µL do corante foram homogeneizados com o sêmen sobre placa aquecedora a 37 °C.

Após incubação por três minutos (OLIVEIRA, 2010) confeccionou-se um esfregaço para realização da leitura. Foram classificados como vivos os espermatozóides que não se coraram e como mortos aqueles que apresentaram o núcleo corado de vermelho. As leituras foram realizadas logo após a realização do esfregaço em aumento de 400 x.

#### **3.1.7.4. Teste de termorresistência (TTR)**

A longevidade dos espermatozóides congelados/descongelados foi avaliada por meio do teste de termorresistência. Após o descongelamento, uma alíquota de 200 µL do sêmen foi incubada em tubo plástico de 1,5 mL em banho-maria a 37 °C por 120 minutos. Foram realizadas avaliações subjetivas, por método de duplo cego (dois avaliadores), em microscopia de contraste de fase, da motilidade total e do vigor. Utilizou-se preparo em câmara úmida, com lâmina e lamínula

(aquecidas a 37 °C), sendo as leituras realizadas nos tempos 0 (T0), 30 (T30), 60 (T60), 90 (T90) e 120 (T120) minutos de incubação.

#### **3.1.7.5. Morfologia espermática**

Uma amostra de 100 µL do sêmen foi acondicionada em tubos plásticos de 1,5 mL contendo 1,0 mL de solução de formol salino (HANCOCK, 1957) a 37 °C. A análise da morfologia foi realizada por preparo de câmara úmida em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1000 x, seguindo classificação descrita por BLOM (1973), onde as anormalidades foram divididas em defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais.

#### **3.1.8. Controle da ovulação e inseminações**

Para facilitar o manejo e concentrar as inseminações, as éguas tiveram o estro induzido com utilização de Prostaglandina-2-alfa (5mg de Dinoprost = 1 mL de Lutalyse® intramuscular) quando em diestro. A rufiação e palpação transretal das éguas foram feitas uma ou duas vezes por semana e aquelas em estro foram submetidas à palpação retal diária, até a detecção de um folículo  $\geq 35$  mm de diâmetro. A partir daí as palpações passaram a ser realizadas a cada 6 horas, até a detecção da ovulação, quando os animais foram então inseminados. Durante o controle folicular foi utilizado diariamente aparelho de ultrassonografia para mensuração do diâmetro do folículo pré-ovulatório e avaliação dos órgãos reprodutivos das éguas.

As éguas a serem inseminadas foram conduzidas ao tronco de contenção e seu preparo consistiu em bandagem e suspensão da cauda, retirada das fezes da ampola retal, lavagem da região do períneo com água e sabão neutro e secagem (Figura 4).



**Figura 4:** Égua devidamente contida em tronco para realização da IA. À esquerda: Cauda suspensa com bandagem e períneo higienizado. À direita: Inspeção do vestíbulo da vagina para detectar possíveis sujidades.

Para o cálculo do número de palhetas a serem utilizadas em cada inseminação, utilizou-se como parâmetro a motilidade total do sêmen descongelado e avaliado previamente, sendo que a dose foi de 300 milhões de espermatozóides móveis.

As palhetas a serem utilizadas foram descongeladas no laboratório e o sêmen de todas reunido num tubo de ensaio de vidro com fundo arredondado previamente aquecido a 37 °C. O tubo foi levado ao local de inseminação em banho-maria na mesma temperatura. Uma seringa de 20 mL foi acoplada à pipeta de inseminação (Minitub®), de 75 cm, para que o sêmen do tubo fosse succionado para a mesma. Desta forma a pipeta foi introduzida no útero da égua já contendo o sêmen. As inseminações foram realizadas depositando-se o sêmen no ápice do corno ipsilateral à ovulação.

Foram utilizados 60 ciclos das 30 éguas, sendo 30 inseminações com sêmen do tratamento 1 (T1 - 1 mg de CCC/120 x 10<sup>6</sup> de espermatozóides) e 30 com sêmen do tratamento 2 (T2 - sem adição de CCC). Vinte e sete ciclos foram utilizados para inseminações com J1 (14 com T1 e 13 com T2). A média da idade das éguas inseminadas com J1 foi de 10,5 anos (variando de 4 a 18 anos).

Para inseminações com J2 foram utilizados 33 ciclos (sendo 16 com T1 e 17 com T2). As éguas tinham idade entre 2 e 18 anos (8 anos em média).

### **3.1.9. Diagnóstico de gestação**

Os diagnósticos de gestação foram realizados entre 12 e 14 dias após a ovulação por meio de ultrassonografia (ALOKA® SSD 500, Japão) utilizando transdutor linear transretal de 5 MHz.

### **3.1.10. Análise estatística**

As variáveis-dependentes consideradas foram: motilidade total do sêmen, vigor espermático, morfologia espermática, reatividade ao HOST e espermatozóides vivos pela coloração com eosina.

As variáveis foram submetidas ao teste de Lilliefors para verificação de normalidade dos dados, e Cochran (números iguais de repetições dentro de cada nível) e Bartlett (números desiguais de repetições) para verificar a homogeneidade das variâncias. Aqueles dados que não atenderam a premissa da ANOVA, foram submetidos à análise não paramétrica e as médias comparadas pelos testes de Kruskal-Wallis com probabilidade de erro de 5%. As variáveis que atenderam às premissas foram submetidas à análise de variância sendo as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro.

A taxa de gestação foi avaliada pelo teste de dispersão de frequência Qui-Quadrado ( $X^2$ ) para verificação das possíveis diferenças entre os tratamentos. Foi utilizado o programa estatístico SAEG (UFV, 1997).

### **3.2. Experimento 2**

O segundo experimento foi realizado durante os meses de setembro de 2010 a janeiro de 2011, no Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa – MG, latitude 20°45'14''sul e longitude 42°52'55''oeste.

#### **3.2.1. Manejo dos animais**

Como doador de sêmen foi utilizado um jumento da raça Pêga (J1) com seis anos de idade (mesmo J1 do experimento 1). Antes do início do período experimental o animal foi submetido ao processo de esgotamento das reservas espermáticas extragonadaais, realizando-se uma coleta diária durante sete dias. O animal se apresentou comprovadamente fértil, conforme exame andrológico e histórico reprodutivo.

O jumento foi mantido em baia e solto durante um período de três a seis horas por dia e recebeu volumoso a base de capim napier picado (*Pennisetum purpureum*) e concentrado farelado nas quantidades que atenderam as exigências nutricionais da categoria para manutenção (NRC, 2007). Sal mineral e água de boa qualidade foram fornecidos à vontade.

Foram utilizados 60 ciclos de 27 éguas mestiças (solteiras, paridas e potras) com predominância do sangue Bretão pertencentes ao setor de Equideocultura do DZO/UFV, com histórico reprodutivo conhecido. As éguas foram mantidas a pasto e recebiam capim napier picado (*Pennisetum purpureum*) e concentrado nas quantidades que atendessem as exigências de manutenção para as categorias (NRC, 2007), sal mineral e água de qualidade à vontade.

#### **3.2.2. Coleta de sêmen**

O sêmen foi coletado em intervalo de 48-72 horas (do dia 22/09/2010 ao dia 27/10/2010), utilizando vagina artificial (modelo Hannover), devidamente preparada com água à temperatura de 45-50 °C.

Foi utilizada jumenta contida por peias como manequim para realização das coletas.

Após a coleta, foram avaliados a motilidade espermática total (0-100%), o vigor espermático (0-5), a concentração (câmara de Neubauer, após diluição de uma parte de sêmen para noventa e nove partes de água destilada), a morfologia espermática e reação ao teste hiposmótico e ao teste de coloração supravital.

### **3.2.3. Preparo da solução de Ciclodextrina Carregada com Colesterol (CCC)**

O preparo da CCC foi semelhante ao experimento 1, porém a solução de trabalho foi preparada pela adição de 50 mg de cristais de CCC em 1 mL de diluidor de centrifugação de MARTIN et al. (1979) (Anexo 7.2) a 37 °C e homogeneizada por agitação com auxílio de um agitador vortex. Esta solução foi mantida congelada a -80 °C até sua utilização, quando foi aquecida a 37 °C e homogeneizada antes da incubação com sêmen.

### **3.2.4. Processamento do sêmen e tratamento com CCC**

Todo o procedimento foi semelhante ao realizado no experimento 1, porém foi utilizado no experimento 2 o diluidor de centrifugação de MARTIN et al. (1979) (Anexo 7.2) para diluição do sêmen, incubação e centrifugação.

### **3.2.5. Congelamento do sêmen**

Semelhante ao experimento 1 (item 3.1.5.).

### **3.2.6. Descongelo do sêmen**

Semelhante ao experimento 1 (item 3.1.6.).



### **3.2.7. Testes *in vitro* para avaliar a viabilidade espermática do sêmen descongelado**

#### **3.2.7.1. Avaliação subjetiva do movimento espermático**

Semelhante ao experimento 1 (item 3.1.7.1.).

#### **3.2.7.2. Teste hiposmótico (HOST)**

Semelhante ao experimento 1 (item 3.1.7.2.).

#### **3.2.7.3. Coloração supravital (vivos e mortos)**

Semelhante ao experimento 1 (item 3.1.7.3.).

#### **3.2.7.4. Teste de termorresistência (TTR)**

Semelhante ao experimento 1 (item 3.1.7.4.).

#### **3.2.7.5. Morfologia espermática**

Semelhante ao experimento 1 (item 3.1.7.5.).

### **3.2.8. Controle da ovulação e inseminações**

Para facilitar o manejo e concentrar as inseminações, as éguas tiveram o estro induzido com utilização de Prostaglandina-2-alfa (5mg de Dinoprost = 1 mL de Lutalyse<sup>®</sup> intramuscular) quando em diestro. A rufação e palpação transretal das éguas foram feitas uma ou duas vezes por semana e aquelas em estro foram submetidas à palpação retal diária, até a detecção de um folículo  $\geq 35$  mm de diâmetro. A partir daí as palpações passaram a ser realizadas a cada 6 horas, até a detecção da ovulação, quando os animais foram então inseminados. Durante o controle folicular foi utilizado diariamente aparelho de ultrassonografia para mensuração do diâmetro do folículo pré-ovulatório e avaliação dos órgãos reprodutivos das éguas.

A ovulação de 24 ciclos (entre éguas solteiras, paridas e potras) foi induzida com 1250 UI de hCG (Vetecor<sup>®</sup>, Hertape Calier) quando

detectado folículo com diâmetro  $\geq 35$  mm e edema uterino, sendo 13 ciclos utilizados para inseminação com T1 e 11 para o T2.

As éguas a serem inseminadas foram conduzidas ao tronco de contenção e seu preparo consistia em bandagem e suspensão da cauda, retirada das fezes da ampola retal, lavagem da região do períneo com água e sabão neutro e secagem.

As palhetas a serem utilizadas foram descongeladas no laboratório em caixa de isopor com água a 37 °C e assim levadas ao curral para inseminação. Uma pipeta flexível de 75 cm (Minitub®) foi introduzida no corpo do útero via vaginal e depois guiada por palpação transretal ao ápice do corno ipsilateral à ovulação, onde o sêmen foi depositado com auxílio de um aplicador também da marca Minitub® por uma segunda pessoa.

Para o cálculo do número de palhetas a serem utilizadas em cada inseminação, utilizou-se como parâmetro a motilidade total das partidas do sêmen no descongelamento prévio, sendo que a dose utilizada foi de 300 milhões de espermatozóides móveis.

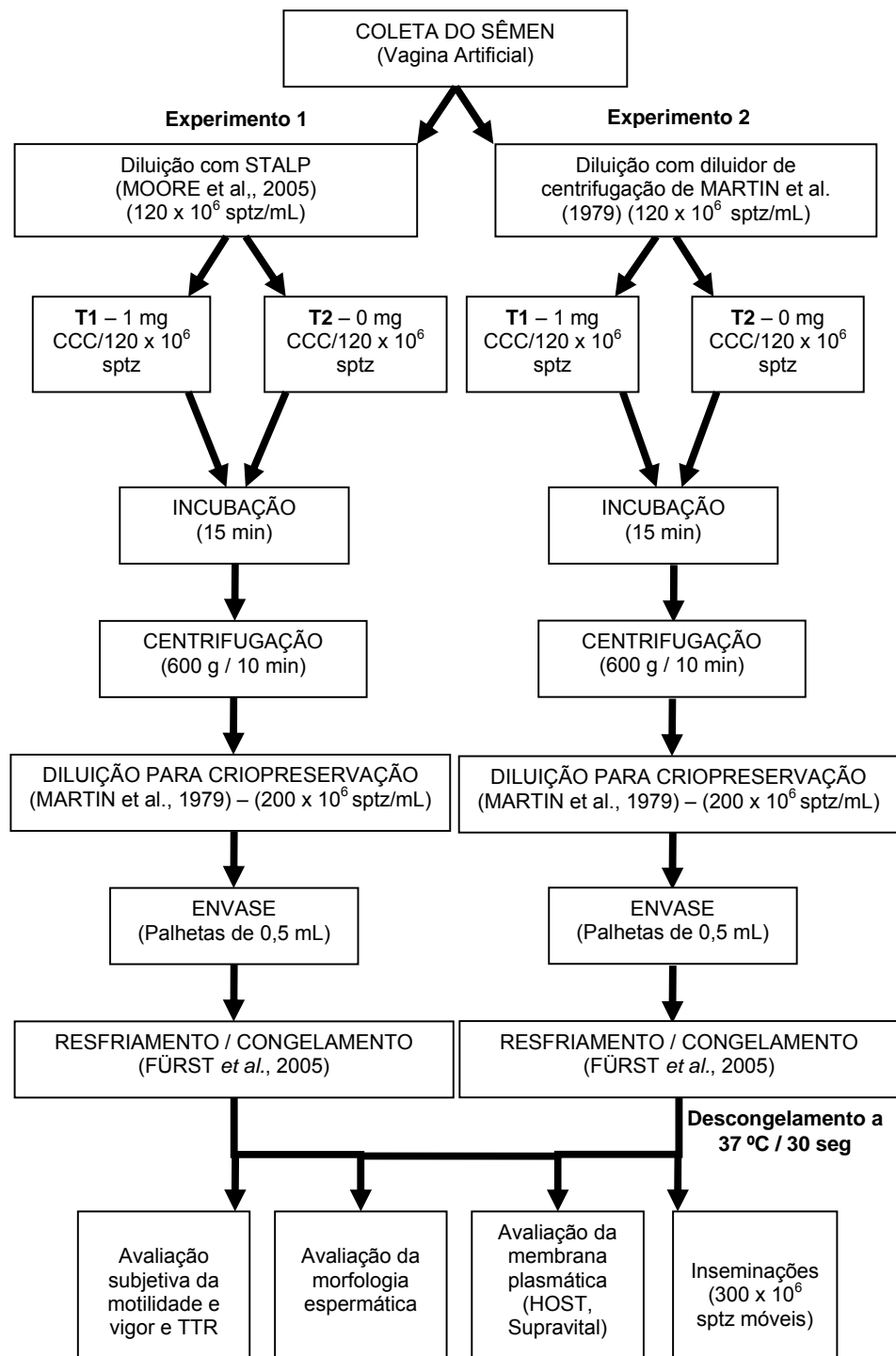
Foram utilizados 60 ciclos de 27 éguas com idade entre 2 e 19 anos (média de 9 anos), sendo 30 inseminações com sêmen do T1 e 30 com sêmen do T2.

### **3.2.9. Diagnóstico de gestação**

Os diagnósticos de gestação foram realizados entre 14 e 22 dias após a ovulação por meio de ultra-sonografia (ALOKA® SSD 500, Japão) utilizando transdutor linear transretal de 5 MHz.

### **3.2.10. Análise estatística**

Semelhante ao experimento 1 (Item 3.1.10.).



**Figura 5:** Esquema simplificado do delineamento dos experimentos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento 1 foram realizadas seis coletas de sêmen do jumento 1 (J1) e seis do jumento 2 (J2), e no experimento 2 realizou-se oito coletas do J1, sendo essas partidas utilizadas para as análises aqui citadas e para realização das inseminações. Os dados de J1 e J2 do experimento 1 foram agrupados para melhor visualização, uma vez que não houve diferença entre eles.

### 4.1. Motilidade total e vigor

Nas Tabelas 5 e 6 estão descritos valores médios e desvios padrão da motilidade total e do vigor do sêmen nas diferentes etapas do processo de congelamento após tratamento com CCC (T1) ou não (T2), para os experimentos 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 5:** Médias e desvios padrão da motilidade total e vigor espermático do sêmen dos jumentos utilizados no experimento 1 em diferentes etapas do processo de congelamento após o tratamento com ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) ou não.

Etapa	Motilidade Total (%)	Vigor (0-5)
SF	83,3 ± 2,5 <sup>A</sup>	3,7 ± 0,3 <sup>A</sup>
SRT1	79,5 ± 2,8 <sup>AB</sup>	3,4 ± 0,3 <sup>B</sup>
SRT2	77,3 ± 3,4 <sup>B</sup>	3,3 ± 0,4 <sup>B</sup>
SCT1	43,7 ± 7,4 <sup>C</sup>	2,9 ± 0,3 <sup>C</sup>
SCT2	37,5 ± 7,8 <sup>D</sup>	2,6 ± 0,3 <sup>C</sup>

SF: sêmen fresco *in natura*. SRT1: sêmen resfriado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SRT2: sêmen resfriado sem adição de CCC. SCT1: sêmen congelado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SCT2: sêmen congelado sem adição de CCC. Valores seguidos por letras diferentes (A, B, C, D) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste SNK.

O sêmen fresco *in natura* nos dois experimentos apresentou valores de motilidade total e vigor dentro dos valores considerados normais pelos autores NISHIKAWA (1959), HENRY et al. (1987),

ARRUDA et al. (1989) e COSTA (1991), sendo que os valores médios foram praticamente iguais (83,3% e 83,7% e 3,7 e 3,8 para motilidade total e vigor, respectivamente, nos experimentos 1 e 2). OLIVEIRA (2010) e KER (2010) observaram motilidade e vigor médios semelhantes, de 83,0% e 3,9 e 83,07% e 3,61 respectivamente.

**Tabela 6:** Médias e desvios padrão da motilidade total e vigor espermático do sêmen do jumento utilizado no experimento 2 em diferentes etapas do processo de congelamento após o tratamento com ciclodextrina carregada com colesterol (CCC) ou não.

Etapa	Motilidade Total (%)	Vigor (0-5)
SF	83,7 ± 2,3 <sup>A</sup>	3,8 ± 0,2 <sup>A</sup>
SRT1	80,6 ± 1,8 <sup>AB</sup>	3,5 ± 0,0 <sup>B</sup>
SRT2	78,7 ± 4,4 <sup>B</sup>	3,4 ± 0,2 <sup>B</sup>
SCT1	52,5 ± 3,8 <sup>C</sup>	3,1 ± 0,2 <sup>C</sup>
SCT2	50,6 ± 5,6 <sup>C</sup>	3,1 ± 0,2 <sup>C</sup>

SF: sêmen fresco *in natura*. SRT1: sêmen resfriado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SRT2: sêmen resfriado sem adição de CCC. SCT1: sêmen congelado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SCT2: sêmen congelado sem adição de CCC. Valores seguidos por letras diferentes (A, B, C, D) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste SNK.

Com relação ao sêmen resfriado o que se observou foi uma queda na motilidade total do sêmen do tratamento 2 (sem CCC) em relação ao sêmen fresco *in natura*, mostrando uma melhor preservação desta característica no sêmen tratado com CCC, cuja motilidade total foi semelhante ao *in natura*. Após o resfriamento foi detectada queda do vigor espermático com relação ao sêmen fresco *in natura* tanto para o sêmen tratado com CCC quanto para o sêmen sem adição de CCC em ambos os experimentos, não havendo diferença entre o tratamento 1 e tratamento 2 pós-resfriamento.

ÁLVAREZ et al. (2005) resfriando sêmen de jumentos por 24 e 48 horas detectaram melhor motilidade total e integridade da membrana plasmática de espermatozóides após a adição de 1,5 e 2 mg de CCC ao meio diluidor.

Para o sêmen congelado/descongelado CANISSO (2008), trabalhando com dois diluidores de congelamento obteve 44% de motilidade total no sêmen de jumentos Pêga. OLIVEIRA (2010) encontrou motilidade total média de 74,8% e 64,2% e motilidade progressiva de 46,5% e 35,7% em análise computadorizada para sêmen com adição de 1 mg e 0 mg de CCC respectivamente ( $p < 0,05$ ).

ÀLVAREZ et al. (2006) obtiveram motilidade total média de 41% e 30% para sêmen descongelado com adição de 1,5 mg e 0 mg de CCC ( $p < 0,05$ ) respectivamente, em análise computadorizada da motilidade. Estes autores também utilizaram meio de congelamento lactose-EDTA, porém com 2,5% de glicerol.

No presente estudo os valores médios das motilidades totais para o sêmen descongelado dos tratamentos 1 e 2 foram respectivamente 43,7% e 37,5% para o experimento 1 ( $p < 0,05$ ) e 52,5% e 50,6% para o experimento 2 ( $p > 0,05$ ). As motilidades acima estão de acordo com o recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998) para sêmen congelado de garanhões, que deve ser superior a 30%. A melhor motilidade do sêmen do tratamento 1 pós-resfriamento foi mantida após o descongelamento no primeiro experimento, mostrando neste caso uma melhor conservação de células móveis após o tratamento com CCC, porém este fato não se repetiu no segundo experimento, onde as motilidades nos dois tratamentos foram semelhantes.

O vigor do sêmen do experimento 1 está pouco abaixo do 3,0 recomendado pelo Colégio ( $T_1 = 2,9$  e  $T_2 = 2,6$ ), sendo que no experimento 2 a média para o vigor foi de 3,1 para ambos os tratamentos. ARRUDA et al. (1989) e CANISSO (2008) observaram vigor de 3,8 e 3,4, sendo que OLIVEIRA (2010) registrou 3,0 e 2,9 para sêmen tratado com 1 mg e 0 mg de CCC. Apesar de ser uma avaliação bastante subjetiva, baseando-se nos achados do presente experimento pode se supor que a estrutura envolvida no metabolismo energético do sêmen descongelado do experimento 1 (principalmente do sêmen sem adição de CCC)

provavelmente foi menos preservada do que a das amostras do experimento 2.

#### 4.2. Integridade física e funcional da membrana plasmática

Estão sumarizados nas Tabelas 7 e 8 as médias e desvios padrão dos percentuais de espermatozóides vivos ao teste supravital e reativos ao teste hiposmótico (HOST) em função das diferentes etapas do processo de congelamento do sêmen do T1 e do T2 durante os experimentos 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 7:** Valores médios e desvios padrão dos percentuais de espermatozóides não corados ao teste supravital e reativos ao teste hiposmótico do sêmen utilizado no experimento 1 em função das etapas do processo de congelamento.

Etapa	Supravital (%)	HOST (%)
SF	84,7 ± 5,8 <sup>A</sup>	86,9 ± 6,0 <sup>A</sup>
SRT1	77,2 ± 6,9 <sup>AB</sup>	65,3 ± 8,0 <sup>B</sup>
SRT2	69,4 ± 10,6 <sup>B</sup>	63,2 ± 9,2 <sup>B</sup>
SCT1	37,3 ± 11,4 <sup>C</sup>	31,7 ± 12,7 <sup>C</sup>
SCT2	33,3 ± 11,1 <sup>C</sup>	18,6 ± 8,3 <sup>D</sup>

SF: sêmen fresco *in natura*. SRT1: sêmen resfriado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SRT2: sêmen resfriado sem adição de CCC. SCT1: sêmen congelado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SCT2: sêmen congelado sem adição de CCC. Valores seguidos por letras diferentes (A, B, C, D) sobrescritas na mesma coluna diferem (p<0,05) pelo teste SNK.

Nos dois experimentos se observou maior percentual de espermatozóides vivos ao teste supravital e maior percentual de espermatozóides reativos ao HOST nos espermatozóides *in natura* em relação aos resfriados (p<0,05). Esses percentuais foram maiores também nos espermatozóides resfriados se comparado aos congelados/descongelados (p<0,05). Isto indica que o processo de congelamento induziu lesões na membrana espermática, como era de se esperar.

**Tabela 8:** Valores médios e desvios padrão dos percentuais de espermatozóides não corados ao teste supravital e reativos ao teste hiposmótico do sêmen utilizado no experimento 2 em função das etapas do processo de congelamento.

Etapa	Supravital (%)	HOST (%)
SF	82,6 ± 4,5 <sup>A</sup>	92,5 ± 2,7 <sup>A</sup>
SRT1	80,0 ± 5,3 <sup>AB</sup>	54,9 ± 9,7 <sup>B</sup>
SRT2	75 ± 4,7 <sup>B</sup>	45,7 ± 14,6 <sup>B</sup>
SCT1	53,1 ± 9,3 <sup>C</sup>	20,9 ± 9,2 <sup>C</sup>
SCT2	50,5 ± 4,5 <sup>C</sup>	16,1 ± 7,4 <sup>C</sup>

SF: sêmen fresco *in natura*. SRT1: sêmen resfriado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SRT2: sêmen resfriado sem adição de CCC. SCT1: sêmen congelado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SCT2: sêmen congelado sem adição de CCC. Valores seguidos por letras diferentes (A, B, C) sobrescritas na mesma coluna diferem (p<0,05) pelo teste SNK.

Ainda, quando considerado os testes SV e HOST para os diferentes tratamentos dentro de uma mesma etapa (resfriado e congelado), houve diferença entre eles apenas no sêmen pós-descongelamento do experimento 1 para o teste hiposmótico, sendo que um percentual maior de espermatozóides do tratamento 1 reagiu ao teste se comparado ao tratamento 2 (31,7% versus 18,6%), mostrando maior quantidade de células funcionais no sêmen tratado com CCC quando se utilizou meio diluidor STALP para incubação/centrifugação (p<0,05).

Ao contrário do encontrado por OLIVEIRA (2010), que observou valores médios de 49,9% e 32,5% (p<0,05) de espermatozóides não corados quando se adicionou 1 e 0 mg de CCC respectivamente, nos presentes estudos não houve diferença entre o sêmen do T1 e do T2 no teste supravital.

Nos dois experimentos o percentual médio de espermatozóides não corados foi semelhante (p>0,05) entre o T1 e T2 (37,3% e 33,3% no experimento 1 e 53,1% e 50,5% no experimento 2, respectivamente), ou seja, a adição de 1 mg de CCC não melhorou a integridade física dos espermatozóides em nenhum dos experimentos.

ÁLVAREZ et al. (2006) encontraram percentual médio de espermatozóides com membrana íntegra e acrossoma íntegro de 30% e



23% para sêmen de jumentos Zamorano-Leonés (nove coletas de três animais) congelados com 1,5 e 0 mg de CCC/120 x 10<sup>6</sup> de espermatozóides, respectivamente (p<0,05).

Quanto ao percentual de células espermáticas reativas ao teste hiposmótico o sêmen fresco *in natura* nos experimentos 1 e 2 apresentou percentuais médios de células reativas de 86,9% e 92,5%, respectivamente. Esses resultados foram superiores aos 51,16% encontrados por CANISSO (2008), trabalhando com seis jumentos da raça Pêga e com a mesma solução hipotônica de incubação.

Em relação ao sêmen resfriado não houve diferença entre o sêmen do T1 e T2 em nenhum dos experimentos (p>0,05), porém o sêmen pós-resfriamento no experimento 1 apresentou percentual maior de células funcionais do que no experimento 2 (65,3% e 63,2%, e 54,9% e 45,7% respectivamente, para T1 e T2), ou seja, pelo HOST houve um prejuízo menor à integridade funcional da membrana dos espermatozóides pós-resfriamento no primeiro experimento, mesmo tendo o sêmen *in natura* neste caso apresentado valor médio de células reativas inferior ao segundo experimento.

Essa melhor preservação da funcionalidade da membrana se repetiu após o descongelamento no sêmen do T1. No primeiro experimento houve 31,7% e 18,6% (p<0,05) de células reativas, e no segundo, 20,9% e 16,1% (p>0,05), para o T1 e T2, respectivamente. Percebe-se que o sêmen tratado com CCC teve maior percentual médio de células funcionais do que o sem adição de CCC, quando se utilizou o meio STALP para incubação/centrifugação do sêmen.

Esses resultados se assemelham aos de OLIVEIRA (2010) e ÀLVAREZ et al. (2006), que encontraram respectivamente 32,6% e 17,8% para sêmen tratado com 1 e 0 mg de CCC, e 31% e 24% para sêmen tratado com 1,5 e 0 mg de CCC. Porém foram inferiores ao encontrado por CANISSO (2008) (42%) e TRIMECHE et al. (1998) (47,6% a 64,8 %),

sendo que os últimos autores trabalharam com solução de 150 mOsmol de frutose e jumentos Poitou.

### 4.3. Morfologia espermática

Nas Tabelas 9 e 10 estão sumarizados os percentuais médios e desvios padrão das anormalidades espermáticas (classificação de BLOM, 1973) em função das diferentes etapas do processo de congelamento do sêmen do T1 e T2 durante os experimentos 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 9:** Valores médios e desvios padrão dos percentuais de anormalidades espermáticas do sêmen do experimento 1.

Etapa	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
SF	3,6 ± 2,3 <sup>B</sup>	3,2 ± 1,9 <sup>C</sup>	6,7 ± 1,0 <sup>B</sup>
SRT1	6,2 ± 2,6 <sup>AB</sup>	12,4 ± 6,0 <sup>A</sup>	19 ± 7,2 <sup>A</sup>
SRT2	9,0 ± 6,5 <sup>A</sup>	11,4 ± 3,2 <sup>A</sup>	19,1 ± 5,2 <sup>A</sup>
SCT1	7,3 ± 3,9 <sup>AB</sup>	9,1 ± 3,6 <sup>AB</sup>	16,4 ± 4,7 <sup>A</sup>
SCT2	8,6 ± 5,4 <sup>A</sup>	7,7 ± 2,3 <sup>B</sup>	16,4 ± 5,1 <sup>A</sup>

SF: sêmen fresco *in natura*. SRT1: sêmen resfriado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SRT2: sêmen resfriado sem adição de CCC. SCT1: sêmen congelado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SCT2: sêmen congelado sem adição de CCC. Valores seguidos por letras diferentes (A, B, C) sobrescritas na mesma coluna diferem (p<0,05) pelo teste SNK.

Se tratando da morfologia espermática os valores aqui encontrados para ambos os experimentos estão dentro dos parâmetros considerados normais pelo CBRA (1998) para garanhões, que são: para monta natural, até 30% de defeitos totais; e para sêmen congelado, até 20% de defeitos maiores e 40% de defeitos totais.

O percentual de defeitos totais do sêmen fresco *in natura* foi inferior ao sêmen resfriado e congelado (p<0,05), não havendo diferença entre essas duas etapas e nem entre os tratamentos numa mesma etapa (p>0,05), ou seja, segundo o teste as anormalidades adquiridas foram devido aos procedimentos de diluição, manipulação, centrifugação e resfriamento, e não ao congelamento propriamente dito.

**Tabela 10:** Valores médios e desvios padrão dos percentuais de anormalidades espermáticas do sêmen do experimento 2.

Etapa	Defeitos Menores (%)*	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)*
SF	4,6 ± 2,6 <sup>b</sup>	1,9 ± 1,0 <sup>B</sup>	6,5 ± 2,6 <sup>b</sup>
SRT1	11,1 ± 5,4 <sup>ab</sup>	5,2 ± 2,9 <sup>AB</sup>	16,4 ± 6,3 <sup>a</sup>
SRT2	13,1 ± 5,1 <sup>a</sup>	4,7 ± 2,2 <sup>AB</sup>	17,9 ± 4,8 <sup>a</sup>
SCT1	12,9 ± 5,0 <sup>a</sup>	6,5 ± 3,1 <sup>A</sup>	19,4 ± 4,3 <sup>a</sup>
SCT2	10,1 ± 4,2 <sup>ab</sup>	4,4 ± 3,1 <sup>AB</sup>	14,5 ± 3,7 <sup>ab</sup>

SF: sêmen fresco *in natura*. SRT1: sêmen resfriado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SRT2: sêmen resfriado sem adição de CCC. SCT1: sêmen congelado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SCT2: sêmen congelado sem adição de CCC. Valores seguidos por letras diferentes sobrescritas (A, B) na mesma coluna diferem (p<0,05) pelo teste SNK.

\* Valores seguidos por letras diferentes (a, b) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste Kruskal-Wallis.

#### 4.4. Longevidade espermática

Na Tabela 11 estão descritos os valores médios e desvios padrão das motilidades totais do sêmen durante incubação a 37 °C por 120 minutos para o teste de termorresistência (TTR) pós-descongelamento no experimento 1. Na Tabela 12 estão os mesmos dados para o experimento 2. Os valores do experimento 1 dizem respeito apenas ao sêmen do jumento 2. As avaliações foram feitas a cada 30 minutos (T0 min, T30 min, T60 min, T90 min, T120 min).

**Tabela 11:** Valores médios e desvios padrão das motilidades totais do sêmen asinino criopreservado com adição de 1 mg de CCC/120 x 10<sup>6</sup> espermatozóides e sem adição de CCC durante incubação a 37 °C para o teste de termorresistência (TTR) no experimento 1.

Tratamento	MOT T0 (%)*	MOT T30 (%)*	MOT T60 (%)	MOT T90 (%)	MOT T120 (%)*
SCT1	44,2 ± 8,0 <sup>a</sup>	40,8 ± 4,9 <sup>a</sup>	35,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	32,5 ± 4,2 <sup>A</sup>	29,2 ± 5,8 <sup>a</sup>
SCT2	40,8 ± 9,7 <sup>b</sup>	38,3 ± 8,2 <sup>a</sup>	32,5 ± 6,9 <sup>A</sup>	30,8 ± 4,9 <sup>A</sup>	26,7 ± 5,2 <sup>a</sup>

SCT1: sêmen congelado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SCT2: sêmen congelado sem adição de CCC.

Valores seguidos por letras diferentes sobrescritas (A, B) na mesma coluna diferem (p<0,05) pelo teste SNK.

\* Valores seguidos por letras diferentes (a, b) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste Kruskal-Wallis.

Nas Tabelas 13 e 14 estão sumarizados os valores médios e desvios padrão do vigor do sêmen descongelado dos tratamentos 1 e 2 nos experimentos 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 12:** Valores médios e desvios padrão das motilidades totais do sêmen asinino criopreservado com adição de 1 mg de CCC/120 x 10<sup>6</sup> espermatozóides e sem adição de CCC durante incubação a 37 °C para o teste de termorresistência (TTR) no experimento 2.

Tratamento	MOT T0 (%)	MOT T30 (%)	MOT T60 (%)	MOT T90 (%)	MOT T120 (%)
SCT1	52,5 ± 3,8 <sup>A</sup>	48,7 ± 6,4 <sup>A</sup>	44,4 ± 4,2 <sup>A</sup>	41,2 ± 5,2 <sup>A</sup>	35,6 ± 4,2 <sup>A</sup>
SCT2	50,6 ± 5,6 <sup>A</sup>	48,7 ± 4,4 <sup>A</sup>	43,7 ± 5,8 <sup>A</sup>	41,8 ± 2,6 <sup>A</sup>	36,2 ± 5,8 <sup>A</sup>

SCT1: sêmen congelado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SCT2: sêmen congelado sem adição de CCC.

Valores seguidos por letras diferentes sobrescritas (A, B) na mesma coluna diferem (p<0,05) pelo teste SNK.

A motilidade total e o vigor do sêmen descongelado dos dois tratamentos se comportaram de maneira bem semelhante nos diferentes tempos de avaliação durante o teste de termorresistência. No experimento 1 apesar do sêmen do T1 ter iniciado o TTR com motilidade superior (p<0,05), esta motilidade se tornou semelhante à motilidade do T2 logo na segunda avaliação (tempo de 30 minutos), permanecendo estas semelhantes até o final do teste (T120).

**Tabela 13:** Valores médios e desvios padrão do vigor do sêmen criopreservado com adição de 1 mg de CCC/120 x 10<sup>6</sup> espermatozóides e sem adição de CCC durante incubação a 37 °C para o teste de termorresistência (TTR) no experimento 1.

Tratamento	VIG T0	VIG T30	VIG T60*	VIG T90	VIG T120
SCT1	3,0 ± 0,2 <sup>A</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>A</sup>	2,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,8 <sup>A</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>A</sup>
SCT2	2,9 ± 0,2 <sup>A</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>A</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>A</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>A</sup>

SCT1: sêmen congelado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SCT2: sêmen congelado sem adição de CCC.

Valores seguidos por letras diferentes sobrescritas (A, B) na mesma coluna diferem (p<0,05) pelo teste SNK.

\* Valores seguidos por letras diferentes (a, b) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste Kruskal-Wallis.

**Tabela 14:** Valores médios e desvios padrão do vigor do sêmen criopreservado com adição de 1 mg de CCC/120 x 10<sup>6</sup> espermatozóides e sem adição de CCC durante incubação a 37 °C para o teste de termorresistência (TTR) no experimento 2.

Tratamento	VIG T0	VIG T30	VIG T60*	VIG T90	VIG T120
SCT1	3,0 ± 0,0 <sup>A</sup>	3,0 ± 0,1 <sup>A</sup>	2,8 ± 0,2 <sup>A</sup>	2,6 ± 0,3 <sup>A</sup>	2,2 ± 0,3 <sup>a</sup>
SCT2	3,2 ± 0,2 <sup>A</sup>	3,1 ± 0,2 <sup>A</sup>	2,8 ± 0,3 <sup>A</sup>	2,7 ± 0,2 <sup>A</sup>	2,5 ± 0,3 <sup>a</sup>

SCT1: sêmen congelado com adição de 1 mg CCC/ 120 x 10<sup>6</sup> spz/mL. SCT2: sêmen congelado sem adição de CCC.

Valores seguidos por letras diferentes sobrescritas (A, B) na mesma coluna diferem (p<0,05) pelo teste SNK.

\* Valores seguidos por letras diferentes (a, b) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (p<0,05) pelo teste Kruskal-Wallis.

A queda nos parâmetros físicos observada durante o TTR para jumentos é mais lenta que para garanhões, provavelmente devido a características estruturais inerentes a cada espécie (MANN et al., 1963). KER (2010) observou uma queda bastante lenta e de apenas 6% da motilidade durante 90 minutos de avaliação. A motilidade inicial média (T0 min) foi 36,1% e a final (T90 min) foi 30,0%.

OLIVEIRA (2010) registrou motilidade total média observada para os tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min de 54,6%, 50,8%, 45,6%, 39,8% e 33,4% para sêmen tratado com 1 mg CCC/120 x 10<sup>6</sup> de espermatozóides e 50,4%, 44,8%, 41,4%, 32,6% e 26,8% para sêmen sem adição de CCC.

No presente trabalho houve uma queda de cerca de 15% na motilidade total durante o teste nos dois tratamentos em ambos os experimentos, sendo que o sêmen do segundo experimento ainda apresentava motilidade total média acima de 30% ao final do teste (35,6% e 36,2% para sêmen do T1 e T2, respectivamente), possivelmente pelo fato de ter apresentado motilidade total média maior ao início das avaliações. No experimento 1 as motilidades totais médias ao T120 min foram 29,2% e 26,7% para sêmen do T1 e T2, respectivamente.

Apesar dos efeitos benéficos do glicerol durante a criopreservação, este apresenta certa toxicidade para espermatozóides asininos (VIDAMENT et al., 2009), sendo responsável pela queda da motilidade total e vigor durante o TTR. A diminuição de nutrientes e produção de

metabólitos tóxicos para os espermatozóides, que durante o teste estão submetidos a condições bem distantes da fisiológica encontrada nos órgãos reprodutivos da égua, também contribuem para a queda dos parâmetros avaliados.

Segundo os resultados para os testes até aqui apresentados o sêmen fresco *in natura* dos experimentos mostrou motilidade total, vigor, percentual de células com membrana íntegra física e bioquimicamente e anormalidades morfológicas dentro dos padrões que permitissem sua criopreservação. De acordo com as mesmas avaliações o sêmen criopreservado e descongelado de ambos os experimentos apresentou-se apto para ser utilizado para a realização das inseminações artificiais.

#### **4.5. Fertilidade**

Tanto o processo de capacitação espermática quanto a viabilidade do ovócito são responsáveis pela ocorrência da fertilização, sendo a que a viabilidade do ovócito nos órgãos reprodutivos envolve um período de 8 a 12 horas (HUNTER, 1990).

Na Tabela 15 estão descritos o tempo médio entre a última palpação onde ainda se detectava o folículo pré-ovulatório e a inseminação, e o tempo médio entre a detecção da ovulação e a realização da IA para os experimentos 1 e 2. No experimento 1 as médias do tempo entre a última palpação e inseminação foram de 6 horas e 29 minutos para as inseminações realizadas com J1 e 6 horas e 38 minutos para J2. Os dados para os experimentos se assemelham ao alcançado por KER (2010), que registrou tempo médio de 6 horas e 35 minutos.

**Tabela 15:** Tempo médio entre último controle folicular e a realização da inseminação e a média de tempo da detecção da ovulação à realização da inseminação para os experimentos 1 e 2.

Experimento	Tempo médio do último controle à inseminação	Média do tempo da detecção da ovulação à inseminação
1	T1: 6h 39min	T1: 44min
	T2: 6h 29min	T2: 43min
	Geral: 6h 34min	Geral: 44min
2	T1: 6h 32 min	T1: 27min
	T2: 6h 23 min	T2: 26min
	Geral: 6h 27min	Geral: 27min

T1: Sêmen congelado tratado com CCC (1 mg de CCC/120 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides).  
T2: Sêmen congelado sem adição de CCC.

NEWCOMBE et al. (2010), num levantamento envolvendo 867 inseminações realizadas em éguas com sêmen equino congelado pós-ovulação, chegaram à conclusão que reduzir o intervalo de controle folicular para menos de 12 horas não aumenta a taxa de gestação. Os autores não obtiveram diferença quando o intervalo controle-inseminação variou de 0-3 (43,2%, n=44), 3-6 (44,7%, n=150), 6-9 (45,1%, n= 432), 9-12 (55,8%, n=190) ou 12-15 horas (54,9%, n=51). Assim, os intervalos do presente trabalho coincidem com o tempo onde o ovócito da égua ainda se encontra viável à fertilização.

As taxas de gestação por ciclo nos experimento 1 e 2 estão sumarizadas na Tabela 16.

**Tabela 16:** Taxas de gestação por ciclo obtidas após inseminação com sêmen tratado com 1mg CCC/120 x 10<sup>6</sup> espermatozoides e com sêmen controle nos experimentos 1 e 2.

Experimento	Jumento	Taxa de gestação sêmen tratamento 1 (com CCC)	Taxa de gestação sêmen tratamento 2 (sem CCC)	Taxa de gestação acumulada
1	J1 e J2	3,3% (1/30)	10,0% (3/30)	6,7% (4/60)
2	J1	20,0% (6/30)	13,3% (4/30)	16,7% (10/60)

(p>0,05)

O diluidor STALP utilizado neste trabalho como veículo da CCC tem sido muito utilizado para realização de experimentos com sêmen *in vitro* principalmente por ser um meio translúcido, facilitando a visualização das células espermáticas, não sendo encontrados relatos de sua utilização para testes de fertilidade *in vivo* com sêmen asinino congelado.

A taxa de gestação no experimento 2 foi de 20,0% (6/30) para éguas inseminadas com sêmen do T1 e 13,3% (4/30) para éguas inseminadas com sêmen do T2, não havendo diferença entre os tratamentos ( $p>0,05$ ). A taxa de gestação geral por ciclo foi de 16,7% (10/60) neste experimento.

FÜRST (2006), utilizando os diluidores de centrifugação e congelamento de MARTIN et al. (1979) no congelamento de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador e Bretão obtiveram 54,7% de gestação com inseminações pós-ovulação. Não foram encontrados na literatura relatos da utilização de diluidor de centrifugação de MARTIN et al. (1979) na diluição e centrifugação do sêmen asinino.

KER (2010) e CANISSO (2008) obtiveram 40% (10/25) e 52% (31/60) de gestação aos 13 dias em éguas inseminadas pós-ovulação com sêmen asinino congelado. Os autores utilizaram o diluidor de KENNEY et al. (1975) para centrifugação do sêmen antes do congelamento, e a mesma dose inseminante que a utilizada no presente estudo.

PAPA et al. (1999) relataram 2 gestações (66%) em éguas com uso de sêmen de jumento congelado em diluidor M9H composto a base de Merk-gema (MARTIN et al., 1979), adicionado de meio a base de leite desnatado e glicose (KENNEY et al., 1975 appud PAPA et al. 1999) e acrescido de Basal Medium Eagle (BME).

OLIVEIRA et al. (2006) trabalhando com Botu-sêmen™ como meio diluidor para centrifugação e meio de congelamento MP50 (PAPA et al., 2002) associando-se diferentes crioprotetores obtiveram 0% (0/53) e 40%



(4/10) de gestação em jumentas e éguas em inseminações pós-ovulação, respectivamente.

Percebe-se que as taxas de gestação obtidas por pesquisadores que utilizaram diluidores a base de leite na centrifugação do sêmen e não utilizaram colesterol foram superiores às encontradas no presente estudo para os dois tratamentos.

Vários métodos laboratoriais sofisticados para avaliação do sêmen vêm sendo utilizados para se predizer a capacidade fertilizante dos espermatozóides. Dentre estes estão as análises computadorizadas do movimento e morfologia espermáticos, proteínas do plasma seminal e membrana espermática, integridade da membrana acrossomal, função mitocondrial, desnaturação da cromatina e peroxidação das membranas espermáticas (ARRUDA et al., 2007).

O sêmen utilizado no presente estudo, apesar de qualificado pelos testes aqui realizados, pode não ter apresentado outras características que não foram investigadas e que são desejáveis para a fertilização, como presença de proteínas específicas (REINERT et al., 1996, MANJUNATH et al., 2002, LEEB et al., 2005, TÖPFER-PETERSEN et al., 2005, TURNER et al., 2005), integridade de cromatina (LOVE et al., 2005) e acrossomo, por exemplo.

Com relação à incorporação de colesterol, alguns autores relataram que a ciclodextrina carregada com colesterol tem a habilidade de atrasar a capacidade de sofrer reação acrossômica de espermatozóides humanos (KHORASANI et al., 2000), equinos (ZAHN et al., 2002; SPIZZIRI et al., 2010b), bovinos (PURDY & GRAHAM, 2004a) e de coelhos (AKSOY et al., 2010), o que pode garantir células viáveis por um período maior de tempo nos órgãos reprodutivos femininos.

Segundo SPIZZIRI et al. (2010b), espermatozóides equinos tratados com CCC mantêm os níveis de colesterol elevados mesmo após o tratamento para induzir a capacitação.

Durante o processo de capacitação espermática ocorrem várias alterações nos componentes da membrana, que podem ser modificados ou removidos por secreções dos órgãos reprodutivos femininos, provocando a desestabilização da bicamada lipídica. Consequentemente ocorre fusão da membrana plasmática com a membrana acrossômica externa, iniciando-se a reação acrossômica (AMANN & GRAHAM, 1992; DELPECH & THIBAUT, 1993; BAZER et al., 1995).

Dentre essas alterações estão a perda de proteínas ou redução de seu peso molecular, redução da proporção de colesterol : fosfolípido e aumento da mobilidade lateral de lipídios e proteínas (DELPECH & THIBAUT, 1993; GADELLA et al., 2001), o que permite abertura dos canais de cálcio e posterior aumento do cálcio intracelular, que é importante para o início do processo de capacitação.

O efluxo de colesterol ocorre devido sua transferência para albuminas e lipoproteínas de alta densidade da tuba uterina (AMANN & GRAHAM, 1992; GADELLA et al., 2001) e desestabiliza a membrana, promovendo a reorganização dos componentes da bicamada como redistribuição de proteínas integrais (AMANN & GRAHAM, 1992; GADELLA et al., 2001).

Como o tratamento com CCC aumenta o teor de colesterol da membrana espermática, o processo de capacitação dessas células como um todo leva um tempo maior para ocorrer. Se tratando da inseminação pós-ovulação como no caso do presente trabalho, este fato parece ser prejudicial, visto que os espermatozóides levam um tempo maior para se tornarem capazes de fertilizar o ovócito já presente na tuba uterina da fêmea, sendo que quando as células espermáticas se tornassem capacitadas à fertilização o ovócito poderia já não se encontrar mais viável.

SPIZZIRI et al. (2010a), trabalhando com o meio STALP para incubação e centrifugação de sêmen de garanhões, obtiveram 15% (3/20) de gestação para o sêmen tratado (1,5 mg de CCC/120 x 10<sup>6</sup> de

espermatozóides) e 28,6% (6/21) para o sêmen sem adição de CCC com inseminações realizadas 30 horas após indução da ovulação com hCG, e ao final do estudo sugeriram que a inseminação com sêmen tratado devesse ser antecipada na tentativa de maximizar a capacidade fertilizante destes espermatozóides.

ZAHN et al. (2002) obtiveram taxas de gestação de 25% (3/12) e 75% (9/12) em inseminações com sêmen tratado com CCC e sem adição de colesterol, respectivamente, em inseminações pós-ovulação. Estes autores utilizaram meio de incubação/centrifugação composto por 50% de diluidor de KENNEY et al. (1975) e 50% de Ringer com lactato de sódio, e também concluíram que o tratamento com CCC atrasa a ocorrência da reação acrossômica.

A fertilidade é uma equação multifatorial que depende do estado reprodutivo da fêmea, do macho e do manejo ao qual os mesmos foram submetidos (AMANN & PICKETT 1987; GRAHAM, 1996; KEITH, 1998; AMANN, 2006).

A inseminação artificial realizada após a ovulação, de acordo com VIDAMENT (2005), é uma metodologia que deveria ser evitada, pois propicia elevados custos com o emprego da inseminação de uma determinada égua, além de elevado número de manejos, pois a égua deve ser palpada frequentemente em pequenos intervalos de tempo. No presente estudo foi empregado indutor de ovulação em vinte e quatro ciclos (13 do T1 e 11 do T2) do experimento 2, sendo naturais os demais intervalos do início do aparecimento de um folículo com 35 mm até a ovulação.

Durante a realização do controle folicular de 6 em 6 horas, éguas que não tiveram ovulação induzida vieram ao curral para este manejo várias vezes, sendo algumas acompanhadas durante até 7 dias. Quando do uso do hCG as éguas foram palpadas no máximo oito vezes (período de 48 horas), o que reduziu bastante o manejo desses animais. SILVA FILHO et al. (1997) trabalharam com diferentes frequências de palpações

retais (6/6 horas, 12/12 horas ou uma vez por dia), utilizando inseminações em dias alternados ou diárias e não observaram influência da frequência de palpação sobre a fertilidade. Ou seja, o simples fato de se incurrir o intervalo entre as palpações para 6 horas não prejudica a fertilidade das éguas.

Porém, no caso do presente trabalho, quando se fez o controle folicular em intervalos de 6 horas foi necessário manter as éguas em piquetes próximos ao curral de manejo. Durante o período da realização das inseminações no segundo experimento as chuvas foram intensas, e a drenagem dos piquetes ficou prejudicada, o que levou ao acúmulo excessivo de água e lama nos piquetes. Tal fato pode ter ocasionado um estresse aos animais durante o manejo no experimento 2, que pode ser justificado pelo maior diâmetro do folículo pré-ovulatório (ANEXO 7.4) neste experimento se comparado ao primeiro experimento, mesmo com a indução da ovulação em 24 ciclos.

Pela ausência de dados até o momento, são necessários mais estudos sobre o efeito da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozóides asininos sobre a fertilidade *in vivo* quando da inseminação de éguas, no que diz respeito ao diluidor utilizado para incubação e momento da inseminação.

## 5. CONCLUSÕES

- A incorporação de 1 mg de CCC para cada  $120 \times 10^6$  de espermatozóides de jumentos antes da criopreservação não melhora o percentual de células espermáticas morfolologicamente normais, o percentual de membrana íntegra nem o vigor do sêmen após descongelamento.
- É superior o percentual de células funcionais bioquimicamente e a motilidade total dos espermatozóides quando se trata o sêmen com 1 mg de CCC para cada  $120 \times 10^6$  de espermatozóides utilizando-se o diluidor STALP como meio de incubação e centrifugação.
- O tratamento com 1 mg de CCC para cada  $120 \times 10^6$  de espermatozóides de jumentos antes da criopreservação não melhora a taxa de gestação em éguas inseminadas pós-ovulação.
- Os testes de viabilidade realizados pós-descongelamento apresentam caráter complementar na avaliação do sêmen asinino congelado, não sendo completamente confiáveis para predizer o real potencial fertilizante dos espermatozóides.
- Nas condições dos presentes experimentos, a utilização do meio STALP e do meio de centrifugação de MARTIN et al. (1979) como meios de incubação e centrifugação resultaram em taxas de gestação insatisfatórias quando da utilização de sêmen congelado de jumentos em inseminações de éguas pós-ovulação.

- Por se tratar de um trabalho pioneiro, é evidente a necessidade de novos trabalhos visando melhorar a fertilidade do sêmen asinino quando se busca a incorporação de CCC.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSOY, M.; AKMAN, O.; LEHIMCIOGLU, N. C.; ERDEM, H. Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 166-172, 2010.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; KEITH, R.; WALTER, P. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. In: **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. Cap. 10, p. 583-595, 2004.
- ALVARENGA, M. A.; LEÃO, K. M. Hysteroscopic insemination of mares with low number of frozen thawed spermatozoa selected by percoll gradient. **Theriogenology**, v. 58, p. 651-653, 2002.
- ÁLVARIZ, A. L.; SERRES, C.; TORRES, P.; CRESPO, F.; MATEOS, E.; GÓMEZ-CUÉTARA, C. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 89-91, 2006.
- ÁLVARIZ, A.L., TORRES, P., SERRES, C., MATEOS, E., GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on cooled semen from Zamorano- Leones donkey. **Rep. Domest. Anim.** 40, 375 (Abstract P134), 2005.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: **McKINNON, A. O., OSS, J. L. (Eds.), Equine reproduction**. Malvern: Lea & Fabiger, p.715-45, 1993.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Practice**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- AMANN, R.P. The fertility dilemma: perception vs actuality. **Equine Veterinary Education**, v.18, p.159-164, 2006.
- AMORIM, E. A. M. Alterações da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen. Viçosa, 2008. **Tese** (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- AMORIM, E. A. M.; GRAHAM, J. K.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M.; TORRES, C. A. A. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, 2009.
- ARRUDA, R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). **Tese de Livre Docência**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 121 p., 2000.
- ARRUDA, R. P., ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C.. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.8-16, 2007.

- ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozoides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 228-229, 2003.
- ARRUDA, R. P.; VIEIRA, R. C.; BARBOSA, R. T.; MANZANO, A. Congelação do sêmen de jumentos: Características reprodutivas de um doador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 1, p. 215, 1989.
- ARRUDA, R. P.; VIEIRA, R. C.; MANZANO, A. Inseminação artificial de eqüídeos com sêmen congelado em palhetas de 0,5 mL. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Universidade Federal de Mato Grosso – Cuiabá – MT, p. 181, 1986.
- BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Sperm cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, 21, 1–7, 2000.
- BARRERA-COMPEAN, M. H.; PURDY, P. H.; DZAKUMA, J. M.; NEWTON, G. R.; NUTI, L. C. Cholesterol-loaded cyclodextrins improves post-thaw goat sperm motility. **Journal of Animal Science**, v. 83(Suppl.1):153, 2005.
- BAVISTER BD, YANAGIMACHI R. The effects of sperm extracts and energy *in vitro*. **Biol Reprod** 1977; 16:228–237.
- BEDFORD, S. J.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, p. 955-967, 1995.
- BIELANSKI, W.; KACZMARSKI, F. Morphology of spermatozoa in semen from satallion of normal fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.27, p. 39-45, 1979.
- BILGILI, S. F.; RENDEN, J. A. Fluorimetric determination of avian sperm viability and concentration. **Poultry Science**, v. 63, n. 11, p. 2275-77, 1984.
- BLOM, E. Interpretation of spermatic citology in bulls. **Fertility and Sterility**, v.1, p.223-228, 1950.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nord Vet Med**, v.25, p.383-391, 1973.
- CANISSO, I. F. Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Viçosa, 189 p., 2008.
- CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; KER, P. G.; RODRIGUES, A. L.; SILVA, E. C.; CARVALHO, G. R.; CARDOSO, R. L. Resposta do sêmen de jumentos em diferentes fases do processo de criopreservação ao teste hiposmótico. In: **Anais do XXXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Gramado – RS. 2008a.



- CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R.; YUDIN, A. I.; LIU, I. K. M.; DROBINS, E. Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 4, p. 289-297, 1993.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 54p, 1998.
- CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. **Tese** (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 186 p. 2005.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F., NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasma, acrosomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. **Proceedings International Congress Animal Reproduction**, 15:511, 2004.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T. M. Changes in sperm quality e lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**. 121(3):395-401, 2001.
- CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; Khar, R. K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 6, n. 2, artigo n. 43, 2005.
- CHRISTIAN, A. E.; HAYNES, M. P.; PHILLIPS, M. C.; ROTHBLAT, G. H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. **Journal of Lipid Research**, 38, 2264–2272, 1997.
- CNA. Estudo do complexo do agronegócio cavalo no Brasil: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada ESALQ-USP/Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil, 70p, **Coletânea Estudos Gleba**, 40, 2006.
- COCHRAN, J. D.; AMANN, R. P.; FROMAN, D. P. et al. W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 °C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology**, v. 22, n. 1, p. 25-38, 1984.
- COMBES, G. B.; VARNER, D. D.; SCHROEDER, F.; BURGHARDT, R. C.; BLANCHARD, T. L. Effect of cholesterol on the motility e plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement** .56:127–132, 2000.
- CORREA, J. R.; ZAVOS, P. M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, 42:351-360. 1994.
- COSTA, A. J. S. A. Avaliação clínico andrológica do jumento da raça Pêga. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1991. 66p. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária - UFMG, 1991.
- CROCKETT, E. L. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. **American Zoologist**, 38, 291–304, 1998.

- CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 7-11, p. 7-11, 1998.
- CROSS, N. L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 4, p. 635-641, 1989.
- CROSS, N. L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J. W.; HANSON, F. W. Two simple methods for detecting acrosome - reacted human sperm. **Gamete Research**, v. 15, p. 213-226, 1986.
- DE LEEUW, A. M.; DEN DAAS, J. H.; WOELDERS, H. The fix vital stain method: Simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 12, p. 112-118, 1991.
- DELL'AQUA Jr., J. A. Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado equino. Botucatu, 2000. 81 p. **Dissertação** (Mestrado)-Faculdade Veterinária – UNESP, 2000.
- DELL'AQUA Jr., J. A.; PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.; ALVARENGA, M. A.; LEONARDO, H. Novo teste hiposmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 189-191, 2002.
- DOBZIUK, H. Molecules with holes – cyclodextrins. In: **Dodziuk H (ed.), Cyclodextrins and their complexes**. Wiley-VCH Verlag GmbH&Co, Weinheim, Germany, pp. 1–30, 2006.
- DOS SANTOS, G. F.. Efeito do método e de taxas de resfriamento sobre as características físicas e morfológicas dos espermatozoides de jumentos (*Equus asinus*), preservados a 5 °C. Belo Horizonte. 1994. 82p. **Dissertação** (Mestrado) – Escola de Veterinária – UFMG, 1994.
- DOTT, H. M. Morphology of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p.41-46, 1975.
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, p.291-304, 1984.
- DREVIUS, L. O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 42, p. 136-156, 1966.
- EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: **KNOBIL, E.; NEILL, J. D. The Physiology of Reproduction**. 2ed. New York: Raven Press. Cap. 2, p. 29-77, 1994.
- EINARSSON, S. Concluding Remarks. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 88, p. 165- 166, 1992.
- FARLIN, M. E.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Assessment of *Psium sativum* agglutinin in identifying acrossosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, p. 23-27, 1992.

- FEO, J. C. S. A. Inseminação artificial equina: Distribuição espermática no trato Genital. Estudo comparativo entre deposição de sêmen no corpo e no corno uterino ipsilateral ao folículo ovulatório. Botucatu. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – UNESP, 28 p., 1991.
- FLEURY, J. J.; CASSOLI, P. D. Inseminação artificial em equino com baixa dose de sêmen congelado. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 27, p. 234, 1999.
- FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V.; BORGES, A. M.; SANTOS, A. D. F.; RODRIGUES, M. T.; OLIVEIRA, R. F. M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p.139-144, 2005.
- FRASER LR. Albumin is required to support the acrosome reaction but not capacitation in mouse spermatozoa *in vitro*. **J Reprod Fertil** 1985; 74:185–196.
- FÜRST, R. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas nas fertilidade do sêmen equino. Viçosa: Departamento de Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, 2006, 96p. **Tese** (Doutorado) – DZO-UFV, 2006.
- FÜRST, R. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. 2002. 46 f. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; Efeito do resfriamento do sêmen sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.599-607, 2005.
- GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.; STOUT, T.A.; COLENBREER, B. Capacitation e the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, 68(3-4):249-65, 2001.
- GALANTINO-HOMMER, H. L.; ZENG, W-X.; MEGEE, S. O.; DALLMEYER, M.; VOELKL, D.; DOBRINSKI, I. Effects of 2- hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 5, p. 638-650, 2006.
- GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A.; PACE, M. M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.
- GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 1401-06, 1997.
- GARNER, D. L.; THOMAS, A. C.; GRAVANCE, C. G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrossomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.34, p.399-404, 1999.

- GLAZAR, A. I., MULLEN, S. F., LIU, J., BENSON, J. D.; CRITSER, J. K.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, v. 59, p. 201-206, 2009.
- GRAHAM, J. K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Animal Reproduction Science**, v. 68:239–247, 2001.
- GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, p. 131-147, 1996.
- GRAHAM, J. K., FOOTE, R. H., HOUGH, S. R. Penetration of zona-free hamster eggs by liposome-treated sperm from the bull, ram, stallion, e boar. **Biology Reproduction** 37(1):181-8, 1987.
- GRAHAM, J. K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R. H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v. 43, p. 55-64, 1990.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America - Equine practice**, v.12, p.131-147, 1996.
- GRAHAM, J.K. Sperm physiology: response to freezing & analysis of sperm function. In: **Annual Meeting of Society for Theriogenology**, 1996, Proceedings.... Society for Theriogenology, p.54-9, 1998.
- GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; BAUMBER, J.; BALL, B. A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v.53, p.1691-1703, 2000.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E, S. E. In: **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: Manole, p.513, 2004.
- HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Manole. Cap. 24, p. 513-535, 1995.
- HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. **Arch Exp Vet Med**, v.38, p.105-114, 1984.
- HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm; what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 73-88, 1990.
- HANCOCK, J. L. **The morphology of boar spermatozoa**. J. Roy. Microsc. Soc., v. 76, p. 84-97, 1957.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to asses membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p. 343-52, 1990.
- HENRY, M.; MCDONNELL, S. M.; LODI, L. D.; GASTAL, E. L. Pasture mating behavior of donkeys (*Equus asinus*) at natural and induced oestrus. **Journal of Reproduction and Fertility** (Suppl.) v. 44, p. 77-86, 1991.

- HENRY, M.; OLIVEIRA, M. M. F.; DIAZ, A. P.; GASTAL, E. L.; TOLENTINO, F. T. Comportamento de jumentos no período de cortejo e ato sexual. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1987, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p. 71.
- HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, 53, 47–58, 2000.
- HUNTER, R. H. F. Gamete lifespans in the mare's genital tract. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, p. 378-379, 1990.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, 70:219-228, 1984.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VER, H. H.; ZANEVELD, L. J. D. The hypoosmotic swelling test: an update. **Archives of Andrology**, v.29,p.105-116, 1992.
- JOHNSON, L. A., MAXUEL, W. M. C., BRISKY, J. R. Staining sperm or viability assessment. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n. 1, p. 37-45, 1996.
- KATILA, T.; SANKARI, S.; MÄKELA, O. Transport of spermatozoa in the reproductive tracts of mares. **Journal Reproduction and Fertility**. Suppl. 56, p. 571-78, 2000.
- KEITH, S.L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Fort Collins, Colorado, USA: Colorado State University, 1998. 104p. **Thesis** (Master of Science), CSU, 1998.
- KELLER, A. Efeito de dois Métodos de Remoção do Plasma Seminal, de três Diluentes e do Tempo de Armazenamento sobre algumas Características Espermáticas dos Equino. 1998. **Dissertação** (Mestrado). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 1998.
- KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W.L. Minimal contamination techniques and preliminary findings. In: American Association equine Practitioners, 1975, **Proceedings...** v.21, p.327-336, 1975.
- KENNEY, R. M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WHITERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion**. Hastings-E.U.A., Society for Theriogenology, 1983.
- KER, P. G. Fertilidade do sêmen congelado de Jumento da Raça Pêga em éguas inseminadas antes e após a detecção da ovulação. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2010.
- KLEIN, U.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with b-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. **Biochemistry**, 34:13784–13793, 1995.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. **Theriogenology**, v.39, p.1279-1289, 1993.

- LAGARES, M. A.; MEIRELLES, L. S.; WALD, V. B.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Efeito de diferentes diluentes sobre a membrana plasmática do espermatozóide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 153-156, 2000.
- LAGARES, M. A.; OLIVEIRA, C. H.; VASCONCELOS, A. B.; VARAGO, F. C.; SOUZA, F. A. Incorporation and removal of cholesterol from stallion sperm membranes during semen cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p.303-304, 2008.
- LEEB T, SIEME H, TÖPFER-PETERSEN E. Genetic markers for stallion fertility – lessons from humans and mice. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.21-29, 2005.
- LINDSEY, A. C.; VARNER, D. D.; SEIDEL Jr., G. E.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18 h at either or 15 °C prior to flow – cytometric sorting. **Theriogenology**, v. 58, p. 659- 662, 2002.
- LODI, L. D.; HENRY, M.; PARANHOS da COSTA, M. Behavior of donkeys jacks (*Equus asinus*) breeding horse mares (*Equus caballus*) at pasture. **Biology of Reproduction Monograph**, 1, 591-598, 1995.
- LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, 105, 119–128, 2008.
- LOVE CC, BRINSKO SP, RIGBY SL, THOMPSON JA, BLANCHARD TL, VARNER DD. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v.63, p.1584-1591, 2005
- MAFFILI, V. V.; TORRES, C. A. A.; FONSECA, J. F.; PROSPERI, C. P.; SANTOS, A. D. F.; BORGES, A. M. Uso de diferentes tempos de incubação no teste hiposmótico em sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.4, p.631-635, 2003.
- MAGISTRINI, M. Semen evaluation. In: **Samper JC. (Ed.). Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: WB Saunders. p. 91-108, 2000.
- MANJUNATH P, THERIEN I. Role of seminal plasma phospholipids-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **J Reprod Immunol**, v.53, p.109-119, 2002.
- MAO, J.; WU, G. M.; PRATHER, R. S.; SMITH, M. F.; CANTLEY, T.; RIEKE, A.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effect of methyl- $\beta$ - cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on *in vitro* fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. **Theriogenology** 64, p. 1913–1927, 2005.
- MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, (Suppl.) v. 27. p 47-51, 1979.
- MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.84, p. 121-133, 2004.

- MATTOS, R. C.; MALSCHITZKY, E.; CASTILHO, L. F. F.; et al. Efeito de diferentes diluentes na sobrevivência de espermatozoides equinos *in vitro*. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 10, 1993, Belo Horizonte, Anais..., v. 2, p. 325, 1993.
- MATTOS, R. Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana. 1995. **Dissertação** (Mestrado). Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 1995.
- MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction of Fertility and Development**, v. 8, p. 1165-1178, 1997.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, n.16, p.125-142, 1984.
- MAZUR, P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**, v. 14, p. 251-272, 1977.
- McDONNELL, S. M. Reproductive behavior of donkeys (*Equus Asinus*). **Applied Animal Science**. 60, 277-282, 1998.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, 327-344, 2002.
- MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 1, p. 71-78, 1999.
- MESEGUER, M.; GARRIDO, N.; MARTINEZ-CONJERO, J. A.; SIMON, C.; PELLICER, A.; REMOHI, J. Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 3, p. 588-594, 2004.
- MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J. K. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45 (Suppl. 2), 57-66, 2010a.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival **Journal of Animal Science**, v.84, p.826-833, 2006.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. Effect of egg yolk, cooling / thawing rates and cholesterol on cryosurvival of rabbit sperm. In: The American Society of Andrology (ed.), 30th Annual Meeting of the American Society of Andrology, Seattle, WA, USA. **Journal of Andrology Supplement** March-April, 79, abstract 121, 2005.
- MOCÉ, E.; PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 236-247, 2010b.
- MOORE, A. I.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v.51, p.241-249, 2005.

- MORAES, E. A.; GRAHAM, J. K.; TORRES, C. A. A.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 148-154, 2010.
- MORAES, E. A.; TORRES, C. A. A.; ROMUALDO, P. L.; GRAHAM, J. K. Delivering cholesterol to boar sperm membranes improve cryosurvival. **Cryobiology**, v. 59, p. 416, (abstract) 2009.
- MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.999-1012, 1992.
- MORRIER A.; BAILEY, J. L. Cholesterol loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin protects ram sperm during cryopreservation and cold-shock. **Theriogenology**, v. 63, p. 423-424, abstract, 2005.
- MORRIS, L. H. A.; TIPLADY, C.; COOK, B.; WILSTER, S.; LI, X.; ALLEN, W. R. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of frozen-thawed ejaculated and epididymal spermatozoa. In: **Havemeyer Foundation Workshop, 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer**. Saari, Finland, 6th-9<sup>th</sup> July, p. 12, 2000.
- MOVASSAGHI, S.; SAKI, G.; JAVADNIA, F.; PANAHI, M.; MAHMOUDI, M.; RHIM, F. Effects of methyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on cryosurvival of spermatozoa from C57BL/6 Mouse. **Journal of Biological Sciences**. 12, 19-25, 2009.
- MÜLLER, K.; MÜLLER, P.; PINCEMY, G.; KURZ, A.; LABBE, C. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 78, 390– 399, 2008.
- NAGASE, H.; NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. Factors affecting survival of spermatozoa. In: International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, 5., Trento. **Proceedings...** Trento: International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1964, v.4, p.410-415, 1964.
- NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial em diferentes concentrações e volumes de espermatozóides criopreservados equino. **Acta Scientiae Veterinariae Supplement**, v.33, p.298, 2005.
- NEILD, D. N.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.
- NEWCOMBE, J.R. Embryonic loss and abnormalities of early pregnancy. **Equine Veterinary Education**. v.12, n.2, p.88-101, 2000.
- NEWCOMBE, J.R.; PACCAMONTI, D.; CUERVO-ARANGO, J. Reducing the examination interval to detect ovulation below 12 h does not improve pregnancy rates after postovulatory insemination with frozen/thawed semen in mares. **Animal Reproduction Science**, in press, 2010.



- NIE, G. J.; JOHNSON K. E. Pregnancy rate in mares following insemination with a low dose of progressively motile or filtered sperm cells deep in the uterine horn. In: **Annual Conference the American College of Theriogenologists, Proceedings**. Society for theriogenology, p. 303. 2000.
- NISHIKAWA, Y. Studies on reproduction in horses. **Tokyo: Japan Racing Association**, 340p. 1959.
- NISHIKAWA, Y.; WAIDE, Y.; ONUMA, H. Studies on reproduction in asses. VII – Morphological studies of semen. Bull Nat Inst Agric Sci Ser G., v.1, p. 47-52, 1952. Resumo em **Anim Breed Abstr**, v.20, p.15, 1952.
- NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Board on Agriculture and Natural Resources. **Nutrient Requirements of Horses, Sixth Revised Edition**, 2007.
- NUNES, R. O Jumento Pêga. In: **I Simpósio Mineiro de Equideocultura**, 2007, Viçosa. Anais... Viçosa: Departamento de Zootecnia- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 33-39, 2007.
- OLIVEIRA, C. H.; VASCONCELOS, A. B.; SOUZA, F. A.; MARTINS-FILHO, O. A.; SILVA, M. X.; VARAGO, F. C.; LAGARES, M. A. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 194–200, 2010.
- OLIVEIRA, J. V.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; MACEDO, L. M.; DELL'AQUA Jr., J. A.; PAPA, F. O. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 82-84, 2006.
- OLIVEIRA, R. R. Efeito *in vitro* da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoides criopreservados de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2010.
- PACE, M. M; SULLIVAN, J. J. Effect of timing insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement** v. 23, p. 115-121, 1975.
- PAPA, F. O. Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de equinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista, 1987.150p. **Tese** (Tese Livre Docência em Reprodução Animal) – FMVZ- Universidade Estadual Paulista, 1987.
- PAPA, F. O., ZAHN, F. S., DELL'AQUA JR., J. A., ALVARENGA, M. A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. **Rev. Bras de Reprod. Anim.** 26, 184–187, 2002.
- PAPA, F. O.; MEIRA, C.; SIMON, J. J.; FERREIRA, J. C. P.; DELL'AQUA Jr., J. A.; LEME, D. P. Pregnancies in mares using donkey (*Equus asinus*) frozen semen. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.27, p.262, 1999.

- PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.209-222, 1992.
- PEGG, D. T.; DIAPER, M. D. The unfrozen fraction hypothesis of freezing injury to human erythrocytes: A critical examination of the evidence. **Cryobiology**, v. 36, n.30, 1989.
- PEÑA, A. L.; QUINTELA, L. A.; HERRADÓN, P. G. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. **Theriogenology**, v. 50, p. 1211-1220, 1998.
- PEÑA, A.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. **Theriogenology**, 52(6):965-80, 1999.
- PICKET, B. W.; VOSS, J. L. Reproductive management of the stallion. **Proceedings Eighteenth Annual Convention A.A.E.P.**, p. 501-531, 1972.
- PICKETT, B. W. Seminal extenders and cooled semen. In: **McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction**. Filadélfia: Lea & Febiger. p. 746-754, 1993.
- PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: **McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, Cap. 83, p. 769-789, 1992.
- PURDY, P. H.; FOX, M. H.; GRAHAM, J. K. The fluidity of Chinese hamster ovary cell and bull sperm membranes after cholesterol addition. **Cryobiology**, 51, 102–112, 2005.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. **Biology of Reproduction**, v. 71, 522–527, 2004b.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J. K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, 48:36-45, 2004a.
- PURDY, P. H.; MOCÉ, E. STOBART, R.; MURDOCH, W. J.; MOSS, G. E.; LARSON, B.; RAMSEY, S.; GRAHAM, J. K.; BLACKBURN, H. D. The fertility of ram sperm held for 24h at 5 degrees C prior to cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, 118, 231–235, 2010.
- QUINN, P. J.; WHITE, I. G. Phospholipid and cholesterol content of epididymal and ejaculated ram spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 1205-1215, 1967.
- RAO, A. R. Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulis with normal and impaired spermatogenesis. 1971. 83f. Thesis (PhD) - Royal Veterinary College, Stockholm, 1971. Resumo em **Anim Breed Abstr**, v.39, p.3254, 1971.
- REERS, M.; SMITH, T. W.; CHEN, L. B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. **Biochemistry**, v.30, p.4480-4486, 1991.

- REINERT M, CALVETE JJ, SANZ L, MANN K, TÖPFER-PETERSEN E. Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP-7, a zona-pellucida-binding protein of the spermadhesin family. **Eur J Biochem**, v.242, p.636-640,1996.
- REVELL, S. G.; MRODE, R. A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, 36:77-86, 1994.
- ROTTEM, S.; YASHOUV, J.; NE'EMAN, A.; RAZIN, A. Composition, ultrastructure and biological properties of membrane from Mycoplasma mycoides var. capri cells adapted to grow with low cholesterol concentrations. **Biochimica et Biophysica Acta**. 323:495-508, 1973.
- SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. **Angewandte Chemie International ed. in English**, v. 19, n. 5, p. 344-362, 1980.
- SAMPER, J, C.; MORRIS C. A. Current methods for a stallion semen cryopreservation: A survey. **Theriogenology**, v.49, 895-03, 1998.
- SAMPER, J.C.; VIDAMENT, M.; KATILA, T.; NEWCOMBE, J.; ESTRADA, A.; SARGEANT, J. Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi center study. **Theriogenology**, v.58, p.647-650, 2002.
- SERRES, C.; RODRIGUEZ, A.; ALVAREZ, A. L.; SANTIAGO, I. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen. **Theriogenology**.v.58,p. 329-332, 2002.
- SILVA FILHO, J. M; FONSECA, F. A; CARVALHO, G. R; PALHARES, M. S; MOTTA, V. A. F; OLIVEIRA, H. N. Efeito da palpação retal e da frequência de inseminações na fertilidade de éguas inseminadas com sêmen fresco diluído. **Arq. bras. med. vet. zootec**;49(2):197-212, 1997.
- SILVA, S. S.; HENRY, M.; NUNES, S. A.; MELLO, S. L. V. Influência do sistema de envasamento sobre a qualidade espermática de jumentos (Equus asinus) avaliada "in-vitro" pós-descongelamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.21, n.3, p.140-146, 1997.
- SINGER, S.; NICHOLSON, G. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science, N.Y.** 175, 720-731, 1972.
- SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; HENRY, M.; TORRES, C. A. A.; SILVA, M. V. G. B.; SILVEIRA, T. S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**,v.36, n.2, p. 387-395, 2007.
- SMILEY, S. T.; REERS, M.; MOTTOLA-HARTSHORN, C; LIN, M.; CHEN, A; SMITH, T. W.; STEELE, G. D. JR.; CHEN, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. **Cell Biology**, v. 88, p. 3671-3675, 1991.
- SOUZA, N. L. Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados eqüinos. Pirassununga. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 76 p., 2001.

- SPIZZIRI, B. E.; FOX, M. H.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Cholesteryl-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 255-264, 2010a.
- SPIZZIRI, B. E.; KAULA, N.; SQUIRES E.L.; GRAHAM, J. K. *In vitro* capacitation of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. 121, p.181–183. 2010b.
- SQUIRES E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUMMER, J. E. Cooled and frozen stallion semen, Fort Collins: Animal Reproduction Biotechnology Laboratory, Colorado State University, **Bulletin (09)**. 1999.
- SUKARDI, S.; CURRY, M. R.; WATSON, P. F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Animal Reproduction Science** 46, 89–96, 1997.
- THOMAS, C. A.; GANER, D. L.; DEJARNETE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.58, n.3, p.786-793, 1998.
- TOMÁS, C.; BLANCH, E.; MOCÉ, E. Evaluación de la motilidad durante el proceso de criopreservación tras la adición o eliminación de colesterol de las membranas plasmáticas de espermatozoides de verraco. In: **Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario-AIDA (ed.), XIII Jornadas sobre Producción Animal**, Zaragoza, Spain. AIDA, Tomo II, pp. 732–734, 2009a.
- TOMÁS, C.; GIL, M. A.; MOCÉ, E.; HERNÁNDEZ, M.; MARTÍNEZ, E. A.; VÁZQUEZ, J. M.; ROCA, J. Exposure fresh sperm to cholesterol-loaded cyclodextrins improves *in vitro* fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm. In: de Kruif, A.; Van Soom, A. (eds), 13th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), Ghent, Belgium. **Reproduction in Domestic Animals**, 44 (Suppl. 3), 128 (Abstract P172), 2009b.
- TÖPFER-PETERSEN E, EKHLASI-HUNDRIESER M, KIRCHHOFF C, LEEB T, SIEME H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.159-170, 2005
- TORRES, C. A. A.; MORAES, E. A.; GRAHAM, J. K.; ROMUALDO, P. L. The effect of adding cholesterol-loaded cyclodextrin on boar sperm cryosurvival. in: Fazleabas AT, Hunt PA, Plant TM, 42nd Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR) "Science for the Public Good", Pittsburgh, PA, USA. **Biology of Reproduction** Special Issue 81, 455, 2009.
- TOYODA Y, YOKOYAMA M, HOSI T. *In vitro* fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn J Anim Reprod*; 16:147–151 (in Japanese). 1971.
- TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P.; GANDEMER, G.; TAINTURIER, D. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for freeze preservation of Poitou jackass sperm. **Cryobiology**, San Diego, v.34, p.385-393, 1997.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LE LANNOU, D.; BARRIÈRE, P.; TAINTURIER, D. Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. **Theriogenology**, Los Altos, v.45, p. 1015-1027, 1996.

- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TANTURIER, D. A procedure for poitou jackass sperm criopreservation. **Theriogenology**, Los Altos, v.50, p.793-806, 1998.
- TROIANO, L.; GRANATA, A. R.; COSSARIZZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cellular Research**, v. 241, p. 384-393, 1998.
- TROWBRIDGE, I. S. Isolation e chemical characterization of a mitogenic lectin from *Pisum sativum*. **Journal of Biological Chemistry** 249(18):6004-12, 1974.
- TULSIANI, D.R., YOSHIDA-KOMIYA, H., ARAKI, Y. Mammalian fertilization: a carbohydrate-mediated event. **Biol. Reprod.** 57, 487–494.1997.
- TURNER RMO, CASAS-DOLZ R, SCHLINGMANN KL, HAMEED S. Characterization of an A-kinase anchor protein in equine spermatozoa and examination of the effect of semen cooling and cryopreservation on the binding of that protein to the regulatory subunit of protein kinase-A. **Am J Vet Res**, v.66, p.1056-1064, 2005.
- VANDERWALL, D.K.; NEWCOMBE, J.R. Early embryonic loss. IN: SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Current Therapy in equine reproduction**. Saint Louis: Saunders& Elsevier, p.374-383. 2007.
- VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; MEYERS, P. J.; MEYERS, S. A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. **Theriogenology**, v.32, n. 4, p. 515-525, 1989.
- VASQUEZ, J. M, MARTINEZ, E. A.; MARTINEZ P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. **Theriogenology**, 47:913-922, 1997.
- VIDAMENT M.; PIERRICK, V.; MARTIN, F. X. ; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v.112, p. 22-35, 2009.
- VIDAMENT, M.; COGNARD, E.; YVON, J-M.; SATTLER, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Evaluation of stallion semen before and after freezing. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33,p.271-277,1998.
- VIDAMENT, M.; VINCENT, P.; YVON, J. M.; BRUNEAU, B.; MARTIN, F. X. Glycerol in semen extender is a limiting factor in the fertility in asine and equine species. **Animal Reproduction Science**. 89, 302–305, 2005.
- VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, G.; ARNAUD, J.; NGUEKAM-FEUGANFG, P.; NOUE, S.; COTTRON, A.; Le TELLIER, F.; NOEL, E.; PALMER, M.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation os stallion semen in modified INRA 82. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.201-218, 2001.
- VIEIRA, R. C.; ARRUDA, R. P.; MANZANO, A. Inseminação intercornual de eqüídeos com sêmen congelado em palhetas de 0,5 mL. In: **Anais da XXII Reunião Anual da SBZ – Balneário Camboriú, SC.** p. 298, 1985.

- WALTERS, E. M., RIEKE A., GRAHAM, J. K., CRITSER, J. K. Improve osmotic tolerance limits of boar spermatozoa treated with cholesterol-loaded methyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Theriogenology**, v. 70, p. 1394, (abstract) 2008.
- WATSON, P. F. Recent developments e concepts in cryopreservation of spermatozoa e the assessment of their post-thawing function. **Reproduction Fertility and Development**, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, 60–61, 481–492, 2000.
- WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: **MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Eds.)**. Effects of Low Temperatures on Biological Membranes. Academic Press, London, p. 189-218, 1981.
- WHITE, I. G. Lipids and calcium uptakes of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 639–658, 1993.
- WOODS, G.L.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J. Effects of time of insemination relative to ovulation on pregnancy rate and embryonic loss rate in mares. **Equine Veterinary Journal**. v.22, p.410-415, 1990.
- YOSHIDA M, MIZOGUCHI Y, SHIGAKI K, KOJIMA T, NAGAI T. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology** 1993; 39:1303–1311.
- ZAHN, F. S., PAPA, F. O., DELL'AQUA Jr., J. A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. **Theriogenology** 58, 237–240, 2002.
- ZENG, W. X.; TERADA, T. Effects of methyl-beta-cyclodextrin on cryosurvival of boar spermatozoa. **Journal of Andrology**, 22, 111–118, 2001.
- ZENG, W. X.; TERADA, T. Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. **Reproduction Fertility and Development**, 12, 223–228, 2000.
- ZOU, C. X.; YANG, Z. M. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during *in vitro* storage under different temperatures. **Theriogenology**, 53:1477-1488, 2000.
- ZÚCCARI, C. E. S. N. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina. **Tese** (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, 121p.1998.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Hepes Buffered Saline Solution (Diluidor STALP)

Hepes Buffered Saline (STALP)		1000 mL
1º	HEPES	2,4 g
	NaCl	2,16 g
	KCl	0,75 g
2º	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16 g
	NaHCO <sub>3</sub>	3,0 g
	MgSO <sub>4</sub>	0,29 g
	Fructose	15,2 g
3º	Na Lactate	3,7 mL
	Na Pyruvate	0,02 g
	Glucose	1,0 g
	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,25 g
	Bovine Serum Albumin (BSA)	3,0 g

\* Osm. (300-310 mOsmol/kg) e pH (7,2-7,4) (MOORE et al., 2005).

## 7.2. Diluidor de MARTIN et al. (1979)

<b>SOLUÇÃO I (diluidor de centrifugação)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
D(+) glicose monohidratada	6,0 g
Citrato de sódio	0,375 g
EDTA	0,370 g
Bicarbonato de sódio	0,125 g
Penicilina procaína	50 UI
H2O bidestilada deionizada (q.s.p)	100 mL
pH	7,3
<b>SOLUÇÃO II (diluidor de congelamento)</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Solução de lactose a 11%	50 mL
Solução I	25 mL
Gema de ovo de galinha	20 mL
Orvus-Es-Paste	0,08 mL
Glicerol	5 mL
Volume final	100,08 mL

## 7.3. Solução hiposmótica (100 mOsmol/Kg)

<b>Solução I: Sacarose 300 mOsmol/kg</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Sacarose	10,269 g
H2O bidestilidade deionizada (q.s.p)	100 mL
<b>Solução II: Sacarose 100 mOsmol/kg</b>	
<b>Reagente</b>	<b>Quantidade</b>
Solução I	100 mL
H2O bidestilidade deionizada (q.s.p)	200 mL
Volume final	300 mL



**7.4. Alguns parâmetros inerentes às éguas inseminadas e à realização dos diagnósticos de gestação das mesmas durante os experimentos 1 e 2.**

<b>Experimento</b>		<b>1</b>		<b>2</b>	<b>Geral (1 e 2)</b>
<b>Jumento</b>		<b>J1</b>	<b>J2</b>	<b>J1</b>	<b>J1 e J2</b>
	<b>2,5 – 6,0</b>	6	10	14	16
<b>Idade das éguas</b>	<b>6,5 – 10,0</b>	6	6	2	7
<b>inseminadas (anos)</b>	<b>10,5 – 14,0</b>	2	2	6	7
	<b>14,5 – 19,0</b>	6	3	5	6
<b>Média de idade das éguas (anos)</b>		10,5	8,0	9	9
<b>Nº de éguas inseminadas</b>		20	21	27	36
<b>Nº de ciclos utilizados</b>		27	33	60	120
<b>Ciclos utilizados / éguas</b>		1,35	1,57	2,22	3,33
<b>Diâmetro do folículo pré-ovulatório (cm)</b>		4,70	4,55	4,87	4,70
		4,62			
<b>Intervalo da realização do diagnóstico de gestação (dias pós-ovulação)</b>		12 - 14		14 – 22	12 – 22
<b>Média da realização do diagnóstico de gestação (dias pós-ovulação)</b>		12,6	13,1	15,2	14,0
		12,9			