



UnB – Universidade de Brasília  
FAV – Faculdade de Agronomia e Veterinária  
Curso de Medicina Veterinária

Nayara Braga Aidar

## **Criopreservação de Sêmen Equino.**

Brasília/DF  
2013

UnB - Universidade de Brasília

Nayara Braga Aidar

## **Criopreservação de Sêmen Equino.**

Monografia apresentada à Banca Examinadora da Universidade de Brasília como exigência final para obtenção do título de Médico Veterinário do curso de Medicina Veterinária.

**Orientador:** Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira

Brasília/DF  
2013

## FICHA CATALOGRAFICA

AIDAR, Nayara Braga.

Criopreservação de sêmen equino. Orientação do Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira, Brasília-DF, Universidade de Brasília. 51p.: il.

Monografia – Universidade de Brasília – UnB/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

1. Crioprotetores 2. Equino 3. Equinocultura 4. Potencial de fecundação; I. Oliveira, I.  
II. Título.

Cessão de direitos

Nome do autor: Nayara Braga Aidar.

Título da Monografia de Conclusão de Curso:

Criopreservação de Sêmen Equino

Ano: 2013

Documento formal, concedendo à Universidade de Brasília a permissão para reprodução de cópias desta monografia e para empréstimos ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos. O autor reserva para si outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são permitidas desde que citada à fonte.

---

Nayara Braga Aidar

## **Criopreservação de Sêmen Equino.**

Nayara Braga Aidar

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira  
Orientador

---

Prof. Dr. Ivo Pivato  
Examinador

---

M.V. Msc. José de Oliveira Carvalho  
Examinador

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais Nina e Raimundo por todo amor e dedicação que tiveram comigo, contribuindo para minha formação como pessoa. E não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida, me dando a base necessária para lutar pelas coisas que almejo.

As minhas irmãs Naira e Nayane, muito obrigada pelo apoio e conselhos dados ao longo dos anos.

Ao meu namorado e grande amigo Pedro Henrique não há palavras para agradecer todo apoio e ajuda que me foi dada na realização deste trabalho e na conclusão deste curso de Medicina Veterinária.

Ao meu orientador Rodrigo Arruda de Oliveira, que graças à paixão que demonstra pelas coisas que faz me inspirou e me mostrou outra área da veterinária que é simplesmente fascinante, a reprodução de equino. Meu muito obrigado pela paciência e por dividir o bem mais precioso que alguém pode ter, o conhecimento.

A Dra. Maria Augusta Alonso, pela oportunidade que me ofereceu de vivenciar um pouco mais da realidade da equinocultura, e pelos ensinamentos e experiências divididos com tanto carinho.

Aos amigos e colegas, pelo incentivo e pelo apoio constantes.

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta monografia.

## RESUMO

A criopreservação de sêmen equino é uma técnica que possibilita um maior e melhor aproveitamento do potencial produtivo e reprodutivo de um animal. Proporciona um aumento da disponibilidade de espermatozoides, se tornando assim um importante instrumento no melhoramento genético da espécie, pela maximização do uso de reprodutores com comprovada superioridade genética. Além de quebra de barreiras geográficas, que torna possível a remessa de sêmen para qualquer parte do mundo, entretanto a dificuldade de se obter uma avaliação de forma precisa da fertilidade do sêmen equino é um fator limitante para o desenvolvimento de novas tecnologias de criopreservação do espermatozoide. O presente trabalho consiste em uma revisão de literatura acerca do tema de criopreservação de sêmen equino, iniciando com a fisiologia do macho e em seguida as etapas da criopreservação que vão desde a colheita de sêmen, análise para congelamento, protocolos de congelamento, componentes dos diluentes até o descongelamento e avaliação do sêmen descongelado.

**Palavras-chave:** Crioprotetores, equino, equinocultura, potencial de fecundação.

## ABSTRACT

The equine semen cryopreservation is a technique that enables a higher and better use of productive and reproductive potential of an animal. Provides increased availability of spermatozoa, becoming an important toll in genetic improvement of the species, by maximizing the use of stallion with proven genetic superiority. Besides breaking geographical barriers, which makes possible to send semen to anywhere in the world, though the difficulty of obtaining a precise evaluation of equine semen fertility is a limiting factor for the development of new technologies for cryopreservation of spermatozoa. This work consists of a literature review on the topic of equine semen cryopreservation, starting with the physiology of the male and then the steps of cryopreservation which speaks of semen collection, analysis to freezing, freezing protocols, components of diluents until thawed and thawed semen evaluation.

**Keywords:** Cryoprotectants, equine, equine breeding, fertilization potential.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Membrana plasmática demonstrando a bicamada fosfolipídica com proteínas periféricas e integrais. ....	4
Figura 2 - Canais não congelados, demonstrando a formação de gelo extracelular .....	8

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>°C</b>	(Graus Celcius)
<b>10<sup>6</sup></b>	(Dez elevado a sexta potência = 1.000.000)
<b>CASA</b>	(Computer Assisted Sperm Analysis – sistema automático de análise de motilidade)
<b>CBRA</b>	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
<b>cm</b>	(centímetro)
<b>DNA</b>	(Ácido desoxirribonucleico)
<b>FSH</b>	(Hormônio folículo estimulante)
<b>GnRH</b>	(Hormônio liberador das gonadotrofinas)
<b>HO</b>	(Teste hiposmótico)
<b>IA</b>	(Inseminação Artificial)
<b>LH</b>	(Hormônio luteinizante)
<b>mg</b>	(Miligrama)
<b>Min</b>	(minuto)
<b>mL</b>	(mililitro)
<b>mm<sup>3</sup></b>	(milímetros cúbicos)
<b>MP</b>	(membrana plasmática)
<b>OVN</b>	(Orgão Vomeronasal)
<b>pH</b>	(Potencial hidrogeniônico)
<b>TTR</b>	(teste de termorresistência)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Fisiologia Reprodutiva do Macho .....	3
2.1.1. Capacitação espermática e reação acrossômica.....	5
2.2. Criopreservação.....	6
2.2.1. Componentes dos diluentes .....	8
2.3. Colheita de sêmen.....	13
2.3.1. Vagina Artificial.....	13
2.3.2. Manequim artificial .....	14
2.3.3. Manequim natural.....	14
2.3.4. Método Farmacológico .....	15
2.3.5. Colheita de espermatozoides do epidídimo .....	16
2.4. Análises para congelamento.....	17
2.5. Protocolos de congelamento .....	19
2.6. Descongelamento.....	21
2.6.1. Algumas técnicas de avaliações do sêmen descongelado .....	22
3. CONCLUSÃO .....	24
4. ESTÁGIO CURRICULAR .....	25
4.1. Introdução.....	25
4.2. Rotina da Fazenda .....	26
4.3. Atividades desenvolvidas na fazenda .....	27
4.3.1. Colheita de Sêmen.....	27
4.3.2. Controle Folicular.....	28
4.3.3. Inseminação Artificial .....	29
4.3.4. Colheita de Embrião.....	29
4.3.5. Inovulação.....	30
4.3.6. Acompanhamentos de Partos e dos potros .....	30
4.3.7. Clínica.....	31
4.4. Conclusão.....	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
ANEXOS .....	42

# 1. INTRODUÇÃO

A equinocultura no Brasil vem se desenvolvendo muito nos últimos tempos, sendo que em certos segmentos, como os esportes, possuem representatividade internacional. O turismo rural é outra área que vem ganhando adeptos, aumentando as opções de renda com a utilização do cavalo. Minas Gerais e Bahia são os estados que possuem os maiores rebanhos, e a região Centro-Oeste é a que possui maior crescimento exponencial. Isso coloca o Brasil com um dos maiores efetivos do mundo. O uso do cavalo ocupa diretamente mais de 640 mil pessoas no país, gerando de forma indireta 3,2 milhões de empregos e movimentando um montante de 7,5 bilhões de reais por ano na economia nacional (LIMA et al., 2012).

Segundo Sullivan et al (1975) e Voss (1993) os equinos são a espécie possuidora dos menores índices de fertilidade, quando comparada com as demais espécies domésticas. Parte desse resultado está relacionada com o fato de que nesta espécie, não ocorreu uma seleção por fertilidade (MERKT, 1986; HUGUES, 1991).

O aumento da demanda nos sistemas de criação equina levou a necessidade do desenvolvimento de técnicas que possibilitassem um maior e melhor aproveitamento do potencial produtivo e reprodutivo de várias espécies domésticas (BRANDÃO, 2008). A criopreservação do sêmen é uma dessas técnicas, que vieram para facilitar e otimizar a produção.

A criopreservação do sêmen proporciona várias vantagens, como aumento da disponibilidade de espermatozoide, facilitando os trabalhos de reprodução assistida. Outras vantagens é a otimização do uso de garanhões com comprovada superioridade genética, com a possibilidade do armazenamento de sêmen, mesmo fora da estação de monta e a quebra das barreiras geográficas, que torna possível a remessa de sêmen para qualquer parte do mundo (BARRETO et al., 2008).

Entretanto, a dificuldade de se obter uma avaliação de forma precisa da fertilidade do sêmen equino é um fator limitante para o desenvolvimento de novas tecnologias de criopreservação do espermatozoide. As técnicas mais eficientes de avaliação, como por exemplo, sistema de avaliação computadorizado das características seminais (CASA), técnicas de coloração,

sondas fluorescentes, citometria de fluxo são mais laboriosas e onerosas. Entretanto na maioria das vezes só são analisadas a motilidade das amostras de sêmen, por ser uma técnica fácil e rápida. Porém essa análise não é capaz de determinar defeitos celulares e possui baixa correlação com a fertilidade do garanhão (ALLEN, 2005). Outras avaliações, tais como coloração supravital, teste hiposmótico que fornecem porcentagem de células espermáticas com as membranas plasmáticas e acrossomal intactas estão mais relacionadas com a fertilidade do que a motilidade espermática (WILHELM et al., 1996; NAGY et al., 2003).

Os avanços na criopreservação de sêmen de equinos só não foram maiores e mais significativas nas últimas décadas devido às restrições impostas por parte das associações de criadores, que não permitiram, por muito tempo, o registro de potros provenientes do uso de sêmen criopreservado. O que as associações alegavam para a proibição é que poderiam aumentar o número de fraudes no registro genealógico (ALVARENGA, 2002).

O objetivo desta monografia é fazer uma revisão bibliográfica sobre a criopreservação de sêmen equino, discorrendo sobre meios de congelamento, métodos de colheita do garanhão, análises que são realizadas no sêmen e protocolos de criopreservação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fisiologia Reprodutiva do Macho

A função reprodutiva do macho está relacionada com a produção de espermatozoides e sua deposição no interior da fêmea. Os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos dos testículos e são então transportados através da rede testis para os epidídimos, onde passam por um período de amadurecimento e são armazenados. Uma vez que tenha sido iniciada a produção de espermatozoides é um processo contínuo (REECE, 1996).

O controle da fisiologia reprodutiva do garanhão é complexo e inclui diversas estruturas que são: o hipotálamo, hipófise, glândula pineal, o órgão vomeronasal (OVN), e os testículos. O hipotálamo é a região responsável pelo primeiro estímulo hormonal no ciclo reprodutivo do garanhão. Através deste, ocorre a liberação pulsátil do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), que age na hipófise anterior, regulando a produção e liberação dos hormônios gonadotróficos, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), que irão atuar nas células dos testículos regularizando a espermatogênese e a esteroidogênese (BERTOL, 2009).

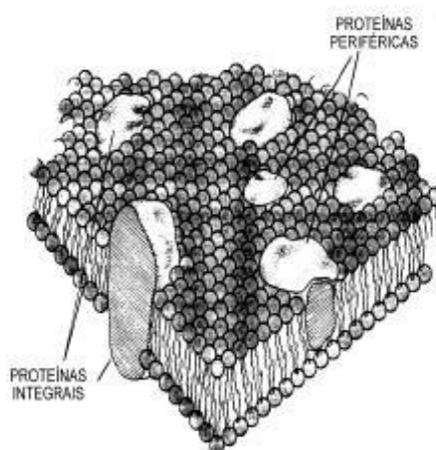
O FSH atua sobre as células de Sertoli e regula a produção de proteína ligadora de andrógenos, estrogênio, fatores de crescimento, inibina e ativina, todos componentes importantes para a produção de espermatozoides. A inibina e a ativina estão relacionadas ao processo de feedback do FSH, regulação do fluido seminífero tubular, manutenção da barreira hemato-testicular, e do desenvolvimento das células germinativas essenciais para espermatogênese (SAMPER, 2009).

Já o LH atua sobre as células de Leydig dos testículos, promovendo o estímulo para a produção dos hormônios esteroides: a testosterona, a diidrotestosterona e estrogênios, que regulam a espermatogênese, glândulas acessórias e a manutenção da libido. Especificamente a testosterona e o estrogênio atuam sobre o hipotálamo e a hipófise no mecanismo de feedback (BERTOL, 2009).

O termo espermatogênese refere-se a todo processo que envolve a transformação das células do epitélio germinativo em espermatozoide. Mitoses e meioses ocorrem progressivamente durante o processo, de forma que os espermatozoides apresentem um número haploide de cromossomos (REECE, 1996). Esse processo ocorre nos túbulos seminíferos que constituem mais de 70% do parênquima testicular (BERTOL, 2009).

A espermiogênese é composta de várias transformações nucleares e citoplasmáticas como perda de grande parte do citoplasma, reorganização dos organelos citoplasmáticos, formação do acrossomo e também de uma transformação de uma célula imóvel para uma célula potencialmente móvel, onde um flagelo foi formado. As espermátides maduras produzidas durante a fase final da espermiogênese são liberadas no interior do lúmen dos túbulos seminíferos como espermatozoides (REECE, 1996).

A célula espermática é revestida mais externamente pela membrana plasmática (MP), composta de uma camada bimolecular de lipídios (fosfolipídios, glicolipídios e colesterol), e proteínas (Fig. 1). É metabolicamente ativa, e devido a sua composição é impermeável à maioria das moléculas. Tem como importante papel isolar a célula do meio exterior e media reações com o meio que a cerca, controlando o fluxo de água e eletrólitos (COOPER, 1996).



**Figura 1- Membrana plasmática demonstrando a bicamada fosfolipídica com proteínas periféricas e integrais.**

Fonte: AMMAN e GRAHAM (1993)

As variações na quantidade de colesterol da membrana plasmática podem não estar somente relacionadas com índices de capacitação, mas podem também afetar a fertilidade e a capacitação do ejaculado de um garanhão de suportar a refrigeração e congelamento (YANAGUIMACHI et al., 1994). Padrões definitivos de lipídios dos espermatozoides de um ejaculado só são estabelecidos após a maturação epididimária (HOLT, 1984; WATSON, 1995).

Quando equiparado às outras espécies, como por exemplo, a ovina, a membrana plasmática dos espermatozoides dos equinos possui maior quantidade de colesterol estimado em 37%. No entanto, esse conteúdo não se difere somente entre as espécies, mas também entre os indivíduos de uma mesma espécie e mesmo entre os ejaculados de um mesmo indivíduo (GADELLA et al., 2001).

Danos à membrana plasmática dos espermatozoides resultam em perdas irreversíveis da motilidade e/ou da capacidade de fecundação. Durante a ejaculação e no trato genital feminino, os espermatozoides são expostos a inúmeros fatores que podem causar danos a sua membrana plasmática ou induzir à morte celular, tais como alterações no meio que os circunda como pH, temperatura e osmolaridade. Por esse motivo somente uma pequena quantidade de células, de bilhões que foram ejaculadas, chegarão ao oviduto (MORRIS et al., 2000).

### **2.1.1. Capacitação espermática e reação acrossômica**

Os espermatozoides ejaculados dos mamíferos são incapazes de fecundar oócitos, sem que antes sofram algumas modificações no trato reprodutivo feminino, esse processo é chamado de capacitação espermática (AMANN e GRAHAM, 1992).

A capacitação espermática é um mecanismo que apresenta uma série de alterações, que irão preparar o espermatozoide para a reação do acrossômica (AMANN e GRAHAM, 1993). Uma dessas modificação é a alteração do padrão de motilidade espermática, que é chamada de hiper-ativação, ou hiper-motilidade. Durante a passagem pelo epidídimo, o espermatozoide adquire uma cobertura glicoprotéica que é acrescida de outras proteínas do plasma seminal, que são

liberadas no momento da ejaculação. A função dessas proteínas é manter a integridade da membrana espermática durante sua passagem pelo trato reprodutivo feminino (TÖPFER-PETERSEN et al., 2005). A capacitação espermática é o processo pelo qual essas proteínas são removidas ou modificada para alterar o fluxo iônico através das membranas, expor sítios de receptores da membrana espermática e remover componentes que estejam cobrindo a cauda, que podem alterar a motilidade hiperativa flagelar. Mudanças similares ocorrem nas porções caudal e rostral da cabeça do espermatozoide, precedendo a reação acrossômica e nas peças intermediária (AMANN e GRAHAM, 1992). A desestabilização da membrana plasmática do espermatozoide é também necessária para sua capacidade fertilizante, esse processo ocorre através da ligação do colesterol da membrana com proteínas da tuba uterina e de origem folicular (EHRENWALD et al., 1990).

A reação acrossômica é um processo que envolve a fusão e a formação de uma vesícula da membrana do acrossoma com a membrana plasmática da célula espermática, permitindo a liberação de suas enzimas hidrolíticas. A reação, no entanto, só irá ocorrer após a ligação do espermatozoide com a zona pelúcida, em algumas espécies, sendo parcialmente induzida por um componente glicoprotéico da zona pelúcida (YANAGUIMACHI, 1994).

## **2.2. Criopreservação**

A criopreservação do sêmen equino se trata de um importante instrumento no melhoramento genético da espécie, pela maximização do uso de bons reprodutores. Porém, os índices de fertilidade obtidos com equinos ainda são muito abaixo dos obtidos com sêmen congelado de bovinos (FÜRST et al, 2005).

A diminuição da taxa de fertilidade observada após o processo de congelamento e descongelamento está relacionada, principalmente, aos danos causados ao funcionamento e às estruturas das membranas dos espermatozoides (PARKS & GRAHAM, 1992).

Desta forma diversos fatores devem ser analisados no congelamento de sêmen de garanhões, como por exemplo: exposição dos espermatozoides a

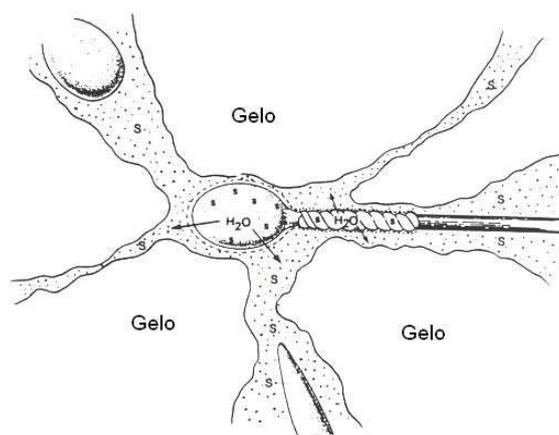
refrigeração, danos causados pelos cristais de gelo e mudanças intracelulares devido à desidratação (AMANN & PICKETT, 1987).

A refrigeração é uma etapa que quando efetuada de modo inadequado, causa choque térmico que induz a ocorrência de danos parcialmente irreversíveis ao espermatozoide, caracterizados por padrões anormais de movimento (circular ou retrógrado), perda rápida da motilidade, lesões no acrossoma, danos à membrana plasmática, redução da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares. Muitos desses defeitos são decorrentes de alterações da membrana plasmática à medida que os espermatozoides evoluem nas transições de fase, do estado líquido cristalino para o estado de gel e durante a refrigeração (GRAHAM, 1996).

Antes do processo de congelamento o sêmen deve ser refrigerado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37 a 20 °C), sem ocasionar danos aos espermatozoides. Para isto é necessário diluir o sêmen em meio adequado. A queda de temperatura de 20°C até 5°C é o momento onde ocorre o maior impacto e ocorre um estresse inicial (SQUIRES et al., 1999), devido à mudança de fase da membrana plasmática, e essa alteração de fase dificulta a permeabilidade dos crioprotetores no meio (GRAHAM, 1996; MEDEIROS, 2002).

Durante o processo de criopreservação, a suspensão de espermatozoides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelamento do meio (super resfriamento), antes que ocorra a formação de cristais. Quando o processo de formação dos cristais de gelo inicia, estes podem lesionar a membrana sendo deletério para o espermatozoide, mas esse efeito pode ser minimizado pelo uso de curvas adequadas de congelamento (SQUIRES et al., 1999).

Quando o processo de congelamento é lento, a água extracelular congela, e como consequência ocorre a concentração de soluto, colocando a célula, momentaneamente, em um meio hipertônico e promovendo perda rápida da água, o que leva à desidratação celular (Fig.2). Por outro lado, quando a célula é congelada rapidamente, não há perda de água, promovendo com isso, a formação de cristais de gelo intracelular (MAZUR, 1985).



**Figura 2 - Canais não congelados, demonstrando a formação de gelo extracelular**  
(SQUIRES et al., 1999)

Sob a temperatura de 5°C, a água intra e extracelular permanece super refrigerada e não cristaliza. No entanto, quando atinge as temperaturas de -5 e -10°C começam a se formar cristais, neste momento, a curva de congelamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular, e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. A perda severa de água promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula causando colapso da membrana plasmática (MEDEIROS, 2002). A perda de água e a desidratação celular são eventos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de formar cristais de gelo dentro da célula, o que ocasionaria danos às estruturas internas e/ou à membrana plasmática (SQUIRES et al., 1999).

### 2.2.1. Componentes dos diluentes

Tanto para a refrigeração como para o congelamento do sêmen, são utilizados diluentes com o intuito de proteger os espermatozoides dos efeitos críticos do processo de congelamento e estabilização dos componentes da membrana plasmática. Para tanto, devem ser adicionados aos diluentes, crioprotetores e macromoléculas como lipoproteínas e fosfolípidios que atuarão como estabilizadores da membrana plasmática. Devemos ainda fornecer fonte de

nutrientes para o metabolismo espermático e meio tampão para a manutenção do pH. (PARKS & GRAHAM, 1992; JASKO, 1994).

Um diluidor ideal, segundo Amann & Pickett, (1987) e Silva Filho (1994) deve propiciar: pressão osmótica compatível com o espermatozoide; apropriado equilíbrio mineral e adequada combinação de nutrientes; sistema com capacidade de neutralizar catabólitos espermáticos; substâncias com capacidade protetora para as alterações de temperatura, principalmente para o frio; capacidade de estabilizar membranas e sistema enzimático; propiciar um ambiente livre de microrganismos patogênicos; baixo custo; não oferecer toxicidade ao espermatozoide; provocar baixa irritabilidade ao aparelho genital e ser de fácil aquisição.

Os diluidores mais utilizados para sêmen equino ao redor mundo, assim como no Brasil, são derivados do diluente desenvolvidos por Kenney et al., (1975), que é feito a base de leite em pó desnatado, glicose e tampão bicarbonato. Diluidores derivados deste meio são encontrados, adicionados de diferentes tipos de constituintes como: antibiótico, açúcares, gema de ovo, aminoácidos, e outros componentes com propriedades favoráveis ao sêmen, sendo que os tipos de diluidores alteram de acordo com o país (SAMPER, 2007).

### **a) Crioprotetores**

A procura por substâncias com propriedade crioprotetoras tem sido motivo de diversas pesquisas. Essa busca tem sido impulsionada devido ao fato de somente uma parte dos ganhões apresentarem sêmen com uma boa resposta ao congelamento, com os meios utilizados. Conforme atestam Arruda et al., (1989) e Alvarenga et al., (2000).

O mecanismo de ação dos crioprotetores baseia-se principalmente na redução do ponto de solidificação da solução no congelamento, promovendo um maior tempo para desidratação da célula, reduzindo assim a formação de cristais de gelo intracelulares (MAZUR, 1970; MERYMAN, et al., 1977; MCGANN, 1978; JONDET, et al., 1984).

Uma segunda função do crioprotetor parece ser sua interação com a membrana celular, exercendo ação estabilizadora durante as mudanças de estado líquido para o sólido, e vice-versa no descongelamento. Outra possível

ação dos crioprotetores é a de diminuir os efeitos das altas concentrações osmóticas durante a desidratação celular, pois muitas moléculas se dissolvem na mistura de crioprotetor e na água, tornando-se menos lesivos para célula (SEIDEL, 1986).

Quando analisadas diversas literaturas, é possível verificar que existe uma divisão básica que classifica os crioprotetores em dois tipos, aqueles que são penetrantes (intracelulares) e os não penetrantes (extracelulares) (KEITH, 1998).

Os crioprotetores intracelulares ou penetrantes atuam através de suas propriedades coligativas, reduzindo o ponto crioscópico intracelular. Desta forma, uma maior quantidade de água permanece no estado líquido quando submetida à baixas temperaturas, reduzindo a concentração intracelular de solutos e proporcionando, assim, um ambiente menos deletério à célula espermática durante o congelamento (WATSON, 1995). Vários crioprotetores já foram utilizados para criopreservação dos espermatozoides, como glicerol, dimetil sulfóxido, etileno glicol e propileno glicol, assim como as combinações deles (SOARES et al., 2009).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado para criopreservação de espermatozoides da maioria dos animais domésticos, inclusive para o equino (GIL et al., 2003). Apesar disto, o glicerol é incriminado como um dos principais responsáveis pela baixa motilidade espermática pós-descongelamento, bem como por reduzir taxas de fertilidade (ALVARENGA, 2002).

As amidas demonstraram boa eficiência no congelamento do sêmen de diversas espécies animais, inclusive a equina. Os resultados atingidos com sua utilização são positivos nos diversos parâmetros espermáticos avaliados, em especial para garanhões que apresentam resultados desfavoráveis com o uso do glicerol (GOMES et al., 2002; MEDEIROS et al 2002; ALVARENGA et al., 2005; CARMO et al., 2005). De maneira geral, as amidas apresentam uma menor toxicidade ao espermatozoide quando comparadas ao glicerol (AMMAN & PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996). Sua eficiência pode estar relacionada ao fato de possuir menor peso molecular em relação ao glicerol, o qual confere uma maior permeabilidade na membrana plasmática e acrossomal, conseqüentemente causa menor dano osmótico aos espermatozoides (MEDEIROS et al., 2003).

Os crioprotetores extracelulares ou não penetrantes atuam como solutos ou colóides, não servindo como solventes. Incluem-se nesta categoria os

açúcares (lactose, frutose, rafinose ou trealose) e polímeros sintéticos (metil celulose) (GRAHAM, 1996).

## **b) Açúcares**

A atuação dos açúcares é através da pressão osmótica, promovendo a desidratação celular, portanto a água passível de ser congelada no interior da célula é reduzida, com isso os problemas causados pela cristalização da água também diminuem (AISEN, 2002). Outra função que o açúcar possui além de crioprotetor, é que este atua como substrato energético para o espermatozoide (YILDIZ et al., 2000), o que gera uma proteção à membrana plasmática durante o período de congelamento e descongelamento, promovendo interações diretas com a membrana, onde estão relacionadas ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolipídios (SOARES, 2009).

Devido ao fato de restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolipídios, os açúcares podem inibir os danos causados pela desidratação extrema, injúria que pode ocorrer com o processo de congelamento. Na maioria dos casos os dissacarídeos (sacarose e trealose) possuem maior eficiência em estabilizar a bicamada da membrana do que os monossacarídeos (DE LEEUW, 1993), permanecendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e manutenção de lipídeos numa fase fluida quando ocorrer ausência de água (ANCHOROGUY et al., 1987; CROWE et al., 1987).

## **c) Gema de ovo**

A gema de ovo proporciona uma proteção aos espermatozoides contra o choque térmico por meio das lipoproteínas de baixa densidade (AMANN & GRAHAM, 1993), que ficam firmemente ligadas aos espermatozoides, em especial a lipoproteína 3 (FOULKES, 1977). Outro fato é que a gema de ovo estabiliza a membrana espermática, pois neutraliza os componentes deletérios que estão presentes no plasma seminal (AURICH, 2005). Porém, a gema de ovo possui como componente a progesterona, o que poderia induzir uma capacitação

espermática precoce, gerando uma redução da fertilidade (LIPAR et al., 1999). Como foi demonstrado por Cheng et al., (1998), onde afirma que a ligação da progesterona exógena marcada ao receptor localizado na membrana plasmática do espermatozoide equino parece atuar como um estímulo na indução da reação do acrossomo.

#### **d) Leite**

Um dos diluentes mais utilizados para sêmen equino é o leite, talvez devido ao fato de suas lipoproteínas possuírem uma atuação semelhante às da gema de ovo na proteção da membrana plasmática (AMANN & GRAHAM, 1992). Proteínas do leite podem estabilizar os elementos proteicos da membrana do espermatozoide (WATSON, 1981). A caseína, por exemplo, liga-se fortemente com íons  $Ca^{++}$ , o que poderia impedir o acúmulo intracelular de quantidades tóxicas de  $Ca^{++}$ , resultantes do dano das membranas. O leite também contém lactenina, proteína de baixo peso molecular e bactericida para cepas de *Streptococcus spp.* (HOCHACHKA, 1987).

#### **e) Antibióticos**

A utilização de antibióticos na composição dos diluidores é uma prática recomendada com o intuito de reduzir o crescimento bacteriano durante o período de armazenamento do sêmen até o momento da inseminação. Entretanto, estes componentes não devem interferir na qualidade seminal ou mesmo prejudicar o estabelecimento da microflora vaginal, o que poderia estimular o crescimento de microorganismos patogênicos (DARENIUS, 1998).

#### **f) Tampões**

O metabolismo espermático funciona de forma contínua o que leva a produção de grandes quantidades de catabólitos tóxicos, que gera um aumento do ácido láctico no meio extracelular. O acúmulo deste componente pode levar a morte dos espermatozoides, devido a alteração drástica que ocorre no pH do meio extracelular, justificando assim a necessidade de adição de tampões ao

diluyente. O fosfato foi o composto primeiramente testado para este fim, porém o citrato de sódio possui uma maior eficiência para esta finalidade. Este aumenta a capacidade de diluição da gema de ovo ao meio líquido, fenômeno que favorece a ação da gema sobre as células (HOLT, 2000).

## **2.3. Colheita de sêmen**

Ao longo de vários anos as técnicas para a colheita de sêmen equino foram desenvolvidas e aperfeiçoadas, podendo ser feita por vários métodos, como a camisa peniana, vagina artificial, esponja, colheita direta da cavidade vaginal ou uterina, métodos farmacológicos e colheita diretamente do epidídimo (GRANEMANN, 2006).

A área utilizada para a colheita de sêmen deve ter um amplo espaço físico, sem poeira, limpa e livre de barulhos, pessoas e animais que possam distrair o garanhão. Garanhões com pouca experiência e jovens devem ser manejados numa área maior do que um garanhão mais experiente e bem treinado. A superfície do solo deve sempre ser abrasiva o suficiente para que possa permitir que o garanhão tenha uma boa tração mesmo se o chão estiver molhado (SAMPER, 2009).

### **2.3.1. Vagina Artificial.**

A colheita de sêmen realizada com o auxílio de vagina artificial (VA) é a mais utilizada pela sua facilidade de aplicação, sendo que estas podem ser de diferentes tipos e modelos: do tipo fechada como Hannover, Nishikawa, Colorado, Missouri, Botucatu; ou do tipo aberta Polonesa (TISCHNER, 1979). Na preparação da VA, esta deve ser preenchida com água, e completada ou não com ar para adequação da pressão interna. De acordo com o modelo de VA a temperatura da água a ser adicionada varia, a escolha do modelo é de acordo com a preferência de cada profissional e de cada garanhão. De modo geral a temperatura será por volta de 48°C a 55°C no preenchimento, para que no

momento da colheita a temperatura interna esteja entre 40 e 42°C (BRINSKO et al., 1999).

### **2.3.2. Manequim artificial**

O manequim artificial é feito com um cilindro oco fechado nas extremidades, e recoberto por material acolchoado com uma superfície não abrasiva e livre de dobras. Deve possuir regulagens de altura e angulação para que assim seja possível promover a adaptação a diferentes pesos e estaturas de garanhões (SAMPER, 2009). Como constaram (SILVA FILHO et al., 1999), a utilização do manequim artificial para a colheita de sêmen proporciona maior segurança tanto para o garanhão como para o veterinário, possibilitando assim que animais mais agressivos, porém com alto valor genético sejam utilizados.

### **2.3.3. Manequim natural**

Garanhões com baixa libido ou com alguma relutância na realização da monta em manequim artificial podem ser estimulados por uma égua no estro antes da colheita, também conhecida como manequim natural. Porém se a égua não estiver receptiva, ela pode mostrar sinais intensos de agressividade (WARING, 2003).

Alguns cuidados devem ser tomados ao se utilizar éguas em cio para a colheita do sêmen, pois estas podem gerar situações inusitadas, tais como: éguas que mesmo no cio não aceitam a monta, que necessitam de “cachimbo” para contenção, que apresentam movimentação lateral que pode colocar em risco o veterinário que está fazendo a colheita. As peias utilizadas para conter os membros posteriores da égua para evitar que o garanhão sofra algum trauma durante a monta podem se soltar durante o procedimento, colocando em risco o garanhão e o veterinário. As vezes durante a descida do garanhão essas peias podem ficar presas ao membro anterior do mesmo o que gera ao animal um risco de fraturas (BERTOL, 2009). Porém se todo cuidado for tomado, e o veterinário estiver atento a qualquer imprevisto, este é um método muito eficiente de colheita.

#### 2.3.4. Método Farmacológico

Segundo Alvarenga et al., (2009) os problemas relacionados ao comportamento sexual são a segunda maior causa de distúrbios reprodutivos encontrados, e se caracterizam na maioria das vezes por distúrbios que interferem na capacidade de ejaculação. Geralmente a ereção e capacidade de monta estão presentes, contudo não ocorre ejaculação.

Para solucionar estes problemas estudos estão sendo desenvolvidos para produzir métodos farmacológicos de indução de ejaculação em garanhões.

Os compostos principais que foram estudados até os dias atuais incluem  $\alpha$ -adrenérgicos e agentes estimuladores da musculatura lisa. Dentre eles estão a xilazina, imipramina, (MCDONEEL, 2001) prostaglandina  $F_{2\alpha}$  (MCDONNELL & LOVE, 1991) e detomidina (ROWLEY et al., 1999).

Os protocolos de indução de ejaculação de garanhões possuem diversas variações de doses, horários de aplicação, vias de administração, combinações de agentes e procedimentos de pré-tratamento que variam de acordo com o caso e o protocolo adotado (MCDONEEL, 2001).

Para os protocolos realizados com a utilização de xilazina, verifica-se que a ejaculação é afetada pelo nível de excitação do garanhão. E embora estes procedimentos sejam realizados enquanto o garanhão não está sexualmente excitado, a taxa de ejaculação pode melhorar se algumas horas antes do tratamento, o animal for submetido a estímulos prolongados. As características de ejaculação variam significativamente entre os protocolos de tratamento, e está aparentemente associada com a contração muscular variavelmente aumentada ou uma pequena inibição das ampolas e glândulas sexuais acessórias. O sêmen obtido utilizando somente xilazina tem normalmente volume, concentração, pH e número total de espermatozoides semelhante aos obtidos do ejaculado através da cópula (MCDONNELL & LOVE, 1991)

O tratamento com a utilização de imipramina (2,0mg/kg que pode ou não ser associada a xilazina 0,2-0,3mg/kg) ou detomidina aparentemente aumenta a contração das ampolas, e inibe a contração das outras glândulas acessórias. Os ejaculados obtidos possuem menor volume, maior concentração, e pH mais baixo do que o ejaculado obtido com a cópula (MCDONNELL, 2001).

O protocolo utilizando PGF<sub>2α</sub> aparentemente aumenta seletivamente a contração das glândulas acessórias, o que resulta em ejaculados de maior volume, concentrações mais baixas, número total de espermatozoides semelhante ao obtido com a cópula, grandes quantidades de gel, e um pH mais elevado do que o obtido em amostras com a cópula (MCDONNELL & LOVE, 1991).

### **2.3.5. Colheita de espermatozoides do epidídimo**

Muitos métodos de recuperação são descritos e variam dependendo do autor e da espécie animal (GRANEMANN, 2006). Existem cinco métodos básicos para recuperação de espermatozoides do epidídimo. Normalmente três técnicas são utilizadas para colheita de espermatozoides de animais mortos e duas são aplicadas a pacientes vivos (GUERRERO, 2006).

As técnicas utilizadas em animais que já estão em óbito são:

Método de Flutuação, técnica de perfusão e a mais utilizada que é a técnica de fluxo retrógrado na cauda do epidídimo. Esta última consiste na separação do complexo testículo-epidídimo remoção dos tecidos que envolvem o epidídimo a partir da dissecação do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo. O segmento é então estendido na posição vertical e feita uma pressão com uma seringa nos vasos deferentes, com a pressão os espermatozoides epididimários são carreados pelo diluente e extravasam pelo corte realizado na junção entre a cauda e corpo epididimal (GARDE et al., 1994). A recuperação espermática com esse método é muito boa em média varia de 15 a 20 bilhões de espermatozoides por epidídimo (BRUEMMER, 2006).

A colheita de espermatozoide da cauda do epidídimo através do fluxo retrógrado é a técnica mais indicada para equinos, pois as amostras obtidas são menos contaminadas e de melhor qualidade seminal em relação aos outros métodos. Possui como limitação o fato de ser usada para grandes animais devido ao tamanho do epidídimo e ser mais complexa que as outras técnicas (MARTINEZ-PASTOR et al., 2006).

Já a aspiração microcirúrgica de espermatozoide do epidídimo (MESA) (TEMPLE-SMITH et al., 1985; SILBER et al., 1994) e aspiração percutânea de

espermatozoides do epidídimo (PESA) (SHRIVASTAV et al., 1994), normalmente são aplicadas em pacientes vivos e são um grande avanço biotecnológico ao combate de infertilidade masculina. Já que fornece uma alternativa para aqueles animais que por algum motivo não conseguem realizar parte de sua função reprodutiva (MONTEIRO et al., 2009).

#### **2.4. Análises para congelamento**

Os pesquisadores têm se dedicado a aprimorar técnicas mais modernas para avaliação do sêmen, entretanto, como são vários os atributos que devem ser avaliados a fim de se determinar o real potencial fertilizante do espermatozoide, uma bateria de testes laboratoriais tem sido investigada. Assim, vários autores recomendam a realização de testes laboratoriais não tradicionais além dos testes que são comumente analisados (LOVE et al., 2001; VARNER, 2003; BOE-HANSEN et al., 2005; NEILD et al., 2005).

Testes *in vitro* são frequentemente realizados para determinação da qualidade do sêmen a ser utilizado em Inseminação artificial (IA) ou em procedimentos de biotecnologia de embriões, por haver relação da qualidade do material seminal e a fertilidade do garanhão (BICUDO et al., 2007). As avaliações laboratoriais que são normalmente realizadas com o objetivo de estimar o potencial de fertilidade de uma partida de sêmen são: motilidade espermática (%); vigor (1-5); concentração espermática (milhões/mL); anormalidades espermáticas (%) e teste de integridade de membranas, plasmática e acrossomal. Estas avaliações vêm sendo utilizadas desde a década de 80, com base nas técnicas e padrões mínimos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal para avaliação do sêmen, *in natura* ou criopreservado (ARRUDA et al., 1992).

Dentre os testes existentes, a avaliação da motilidade é comumente usada, por ser relativamente simples e barata. Apesar de este método não avaliar os atributos que os espermatozoides devem possuir para fecundação (GRAHAM, 2001; SQUIRES et al., 1999). Com relação à viabilidade espermática essa técnica é bem indicada, em razão de a sua queda ser acompanhada pelo decréscimo do número de células com integridade estrutural (ZÚCCARI, 1998).

Programas computadorizados para avaliação espermática podem ser mais objetivos e oferecer resultados com maior repetibilidade nas avaliações, do que somente a utilização da habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de anormalidade espermática (Arruda et al., 2003). A avaliação da cinética de um grande número de espermatozoides pode ser determinada em análise do movimento espermático monitorada por computador, no qual cada trajetória percorrida pela cabeça do espermatozoide é registrada, reconstituída e mensurada. O sistema automatizado de análise de motilidade (CASA) proporciona a oportunidade de avaliar múltiplas características espermáticas em uma única amostra de sêmen com alto grau de repetibilidade (MORTIMER & MAXWELL, 2004). O poder de análise deste tipo de teste é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozoides com alto grau de objetividade, podendo assim aprimorar o processo de avaliação seminal dos animais domésticos (VERSTEGEN et al., 2002).

A vantagem do sistema de avaliação computadorizada é que diminui a possibilidade de erros, por ser mais objetivo, além de disponibilizar mais informações tais como a velocidade e o tipo de trajetória dos espermatozoides. As desvantagens do uso desta técnica estão relacionadas aos custos necessários para cada avaliação (SQUIRES et al., 1999; AURICH, 2005).

Avanços recentes na tecnologia de coloração também têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozoides em diversas espécies. Para as avaliações através de esfregaço e coloração normalmente utilizam como corantes a hematoxilina-eosina ou giemsa, as de bengala. Porém vale ressaltar que as técnicas que usam corantes em esfregaços de sêmen podem produzir danos às estruturas espermáticas durante sua confecção, o que não acontece em preparações úmidas. As preparações úmidas são as mais simples e fidedignas para o estudo do acrossoma, bem como de outras estruturas espermáticas, sendo mais recomendado o tampão fosfato associado à baixa concentração de glutaraldeído (BATH & OKO, 1989 out put BICUDO et al., 2007).

Outra possibilidade é o uso de sondas fluorescentes, que monitoram a funcionalidade ou a integridade das estruturas dos espermatozoides, as quais possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo um diagnóstico mais rápido, fácil e direto, dependendo somente das

características físicas do espermatozoide (CELEGHINI et al., 2007). Para a determinação da integridade do acrossomo, tem sido popularizada a combinação de sondas fluorescentes, como o isotiocionato de fluoresceína (FITC) associado a aglutininas como a do *Ricinus communis* (RCA) e *Psium sativum* (PSA), os quais apresentam capacidade de ligação a glicoproteínas específicas da membrana acrossomal (ARRUDA et al., 2005). A combinação de vários corantes fluorescentes disponibiliza uma avaliação de diversas estruturas simultaneamente, além de distinguir células espermáticas viáveis e não viáveis (SOARES et al., 2009).

Embora o uso de sondas fluorescentes por microscopia seja um método eficaz para avaliação espermática, o número de espermatozoides avaliados normalmente não excede 200, o que dificulta a avaliação de grandes quantidades de amostras. Desta forma, a citometria de fluxo surge como uma técnica vantajosa em relação às formas clássicas para avaliação da célula espermática, uma vez que este sistema automatizado tem a capacidade de examinar 10.000 espermatozoides em menos de um minuto, permitindo maior exatidão nos resultados. Porém, apesar de cientistas procurarem intensamente desenvolver técnicas laboratoriais que predizem com exatidão a fertilidade do sêmen, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar seu potencial de fecundação (ARRUDA et al., 2004).

## **2.5. Protocolos de congelamento**

O sêmen deve ser diluído para que se realize a centrifugação com a finalidade da remoção de grande parte do plasma seminal, e concentração do ejaculado para posterior adição do diluente de congelamento (ASHWOOD-SMITH, 1987). Apesar de ser necessária, a centrifugação não é um processo inócuo para o espermatozoide, e pode ser considerado um ponto crítico, por existir o risco a indução da peroxidação dos lipídeos da membrana (PARINAUD et al., 1997).

Para a centrifugação, a porção livre de gel do ejaculado é diluída em meio apropriado até obter concentração de aproximadamente,  $50 \times 10^6$  sptz/mL. O meio diluente é então pré-aquecido a 37°C e o sêmen diluído é colocado em

tubos de 15 ou 50 ml e centrifugado por 10 a 15 minutos a 400 – 600xg. Os diluidores normalmente utilizados para o processo de centrifugação são: Kenney, citrato-EDTA, glicose-EDTA e lactose-EDTA, glicose-leite desnatado, leite desnatado UHT, INRA, entre muitos outros (MARTIM, et al., 1979; MCKINNON, 1996; VIDAMENT, 2005).

Após o processo de centrifugação, o sobrenadante é aspirado e desprezado, em seguida resuspende-se o “pellet”, constituído de espermatozoides, no meio diluente de congelamento, na proporção de 1:1, ou próxima desta. Esta pequena diluição inicial é feita para realizar o cálculo da concentração e assim ajustar o volume para obter a concentração espermática por mililitro desejada. Uma redução de 10% da motilidade espermática pela centrifugação é considerada aceitável (MCKINNON, 1996). Tem-se utilizado em média concentrações finais que variam de 25 a 400 milhões espermatozoide/mL (JASKO, 1994; VIDAMENT et al., 1997). Contudo os melhores resultados são observados com concentração de 100 ou 200 milhões de espermatozoides/mL (NASCIMENTO, 2006).

O envase do sêmen diluído é feito em seguida, em palhetas plásticas com capacidade de 0,5mL ou 0,25mL com o objetivo de obter um congelamento mais uniforme das amostras (VIDAMENT et al., 1997).

O próximo procedimento a ser realizado é a refrigeração para estabilização da membrana plasmática. As taxas de resfriamento podem ser divididas dentro de três categorias: lentas (menor que 0,33°C/min); médias (0,33°C/min a 1,0°C/min) e rápidas (maior que 1,0°C/min). A mais utilizada é a refrigeração média, e este processo é realizado por aproximadamente 35, até estabilizar a temperatura em 5°C (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984).

O que vem a seguir no processo de criopreservação é o congelamento do sêmen. Não se tem um protocolo pré determinando para chegar a uma curva ideal, pois esta depende de vários fatores, como por exemplo, à composição do meio diluidor, a adição do crioprotetor, qual a concentração do crioprotetor e taxas de resfriamento (HEITLAND et al., 1996). Na maioria dos protocolos atualmente disponíveis para o congelamento é utilizada uma curva de congelamento rápida de -60°C/min., sendo obtida pela exposição das palhetas horizontalmente, 6 cm acima do vapor de nitrogênio por 15 a 20 minutos (AMANN e PICKETT, 1987).

Congeladores programáveis são muito convenientes para o congelamento de grandes quantidades de palhetas de sêmen, além de proporcionar um maior controle da taxa de congelamento. O benefício de muitos congeladores programáveis é que a curva de refrigeração pode ser programada, por exemplo, 4 a 5°C por 4min., de -5 a -110°C por 25min. E de -110 a -140°C por 35min. e, somente depois, as palhetas de sêmen são mergulhadas em nitrogênio líquido (PURDY, 2006).

## 2.6. Descongelamento

A curva de descongelamento varia de acordo com o tipo de envasamento e do tempo de exposição a uma determinada temperatura (PICKETT & AMANN, 1993).

Quando o congelamento é feito com curva muito rápida, não há tempo suficiente para que uma desidratação adequada ocorra, resultando em grandes cristais de gelo que são formados no meio intracelular. Portanto para o descongelamento a velocidade também necessita ser rápida, para que não ocorra a recristalização (fusão de cristais de gelo) e, conseqüentemente lesão celular. Da mesma forma o congelamento lento requer um descongelamento lento. Pois neste caso, a desidratação celular é maior e necessita de um tempo maior para que ocorra a re-hidratação espermática, para que a célula não perca a sua viabilidade morfofuncional (MAZUR, 1985).

Holt (2000) sugere que para o descongelamento de amostras de sêmen testando com diferentes curvas de aquecimento é recomendável utilização de temperaturas relativamente altas de banho-maria entre 60°C e 70°C durante 7 segundos.

Já em estudos realizados onde o foco era avaliar diferentes tipos de envasamentos e sua influencia no descongelamento, foi concluído que, para o envasamento em palhetas com capacidade para um volume de 0,5 e de 0,25 mL e macrotubos de 4 mL, a temperatura que proporcionou melhores parâmetros espermáticos como motilidade progressiva, em análises computadorizadas, foi 65°C por 6 segundos (DELL' AQUA JUNIOR e PAPA, 2001).

### 2.6.1. Algumas técnicas de avaliações do sêmen descongelado

Os critérios estabelecidos para o uso de sêmen descongelado na IA (Inseminação Artificial) têm sido preconizados como sendo no mínimo 30% de motilidade total logo depois de finalizado o processo de descongelamento (CRISTANELLI et al., 1984; LOVE et al., 1989). Entretanto somente a avaliação da motilidade espermática não informa de forma adequada a real capacidade de fecundação do sêmen (GRAHAM et al., 1996). No Brasil, o CBRA (1998) estabelece como parâmetro para condenação do sêmen congelado valores inferiores a 30% de motilidade total, vigor menor que três e acima de 40% de espermatozoides com defeitos.

Devido ao fato dos parâmetros convencionais das características espermáticas mostrarem baixa, ou nenhuma correlação com a fertilidade, outras técnicas têm sido desenvolvidas com o objetivo de avaliar melhor a capacidade fecundante do sêmen nas diferentes espécies (JEYENDRAN et al., 1984; SMITH & MURRAY, 1997; VAZQUEZ, 1997; MELO, 1999).

Dentre os testes que tem como objetivo dizer com maior acurácia a capacidade fertilizante do gameta masculino pode se citar as técnicas que utilizam corantes específicos, microscopia eletrônica ou avaliação do comportamento do sêmen diante das soluções hiposmóticas esses testes são: (FÜRST, 2006).

a) Coloração supravital: também conhecida como coloração de vivos e mortos, é a utilização de corantes derivados da fluoresceína, que podem ou não estar combinados com outros corantes de fundo. A ação desses corantes é dependente da integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça do espermatozoide, permitindo ou não a penetração no compartimento nuclear deste (GARNER et al., 1986). Os corantes utilizados para esta finalidade é a eosina e a nigrosina. A eosina é um corante supravital que não penetra em células quando estas possuem a membrana plasmática intacta, mas, quando lesadas, estas são coradas em rosa. A nigrosina é responsável pelo contraste mais escuro de fundo da lâmina, o qual permite a visualização dos espermatozoides não corados. Portanto, este teste tem sido recomendado como uma avaliação adicional àquelas de rotina (Brito, 2007).

b) Teste hiposmótico: é o método utilizado para se verificar a integridade funcional da membrana da célula espermática em diversas espécies (FÜRST, 2006). Este teste é baseado na capacidade que o espermatozoide possui de reagir quando exposto a soluções hiposmóticas. Isso se deve ao fato de que nessas condições ocorre o influxo de água para dentro da célula, para que um equilíbrio osmótico seja estabelecido entre o meio extra e intracelular, provocando o aumento de volume na célula e posterior dobramento da cauda (JEYENDRAN et al., 1992). A reatividade da membrana espermática ao meio hiposmótico está provavelmente relacionada com a presença de um mecanismo iônico ativo na membrana celular, envolvendo o sistema de bomba de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  (DARNNEL et al, 1986).

c) Teste de termorresistência (TTR): consiste na incubação do sêmen a temperatura de  $36^\circ\text{C}$  por um período de 30 minutos. Neste teste são analisados motilidade e o vigor espermático ao longo desse tempo. Vários fatores vão influenciar no resultado deste teste, dentre eles: efeito do ejaculado (PINTO et al., 1978), método de congelamento (PICKETT et al., 1961) e efeitos do tempo incubação (JONDET, 1980).

### **3. CONCLUSÃO**

O desenvolvimento da criopreservação foi de grande importância para equinocultura, sendo que desde o seu surgimento, esta tem sido aprimorada, através do desenvolvimento de diferentes diluentes e de sua técnica.

Na realização do congelamento de sêmen são utilizados crioprotetores e a procura por substâncias com propriedade crioprotetoras é estímulo para diversas pesquisas, devido ao fato de somente parte dos garanhões apresentarem sêmen com uma boa resposta ao congelamento, com os meios hoje utilizados.

Além disso a utilização e o desenvolvimento de testes laboratoriais adicionais tem ajudado no processo de avaliação das amostras, possibilitando a utilização de informações mais confiáveis e precisas.

A criopreservação de sêmen equino oferece diversos desafios a serem desvendados e ainda há muito que se desenvolver. Porém é uma área que a cada ano vem ganhando mais espaço à medida que as associações de criadores passam a ver essa ferramenta, como um facilitador do manejo.

## 4. ESTÁGIO CURRICULAR

### 4.1. Introdução

O estágio final ou curricular foi realizado em uma central de reprodução, na fazenda Santa Rita II, no Estado de São Paulo na cidade de Piracaia, no período de 03/09/2012 a 01/12/2012. O foco de atuação no estágio era na área de bitecnologia da reprodução.

A fazenda contava com aproximadamente 160 equideos, destes 35 eram animais pensionistas, 80 receptoras, 14 doadoras, 2 cavalos de serviço, 5 garanhões e 1 jumento, o restante animais da raça Mangalarga, de propriedade da fazenda. Esses animais eram divididos em um espaço de 70 piquetes formados de capim tifton-85, sendo que os piquetes não possuíam tamanho padronizado e juntos totalizavam uma área de 50 hectares, em sua maioria contendo cerca elétrica, ou somente cerca de madeira.

Além da estrutura dos piquetes a fazenda contava também com pavilhões de cocheiras com um total de 44 baias, de tamanhos variados, que eram forradas de acordo com a necessidade de cada animal, feno ou serragem. Em um dos pavilhões também continha uma farmácia, onde parte do estoque de medicamentos era armazenado. Próximo a esse pavilhão também havia dois picadeiros para o trabalho com os animais Mangalarga.

Outra estrutura que fazia parte da fazenda era um laboratório equipado com os principais equipamentos utilizados na reprodução equina, que eram autoclave, estufas, centrífuga, microscópio, lupa e mesa aquecedora. Anexado ao laboratório havia dois bretes de contenção de metal, utilizados para procedimentos como colheita, inovulação de embriões e inseminação artificial.

O espaço reservado para a realização do controle folicular das receptoras e doadoras era um pavilhão coberto, com 34 bretes de madeira, e a contenção das éguas era feita através de cordas.

Para a colheita de sêmen a fazenda possuía um manequim artificial. A estrutura da fazenda contava ainda com seis casas para funcionários e uma casa para estagiários.

E para as tarefas diárias a fazenda possuía seis funcionários, e estes realizavam funções variadas, como manutenção desta e funções ligadas diretamente a lida com os animais.

As principais atividades desenvolvidas na fazenda eram: controle folicular de doadoras e receptoras, colheita de sêmen, transferência de embrião, inseminação artificial, colheita de embriões, neonatologia e manejo de equídeos.

#### **4.2. Rotina da Fazenda**

As atividades na fazenda Santa Rita iniciavam às 7 horas da manhã com o fornecimento da primeira alimentação aos animais. E alguns destes também recebiam suplementos ou eram medicados, função essa realizada pelos estagiários. Finalizado esse processo os animais que dormiam em baias eram soltos nos piquetes.

Todos os dias as baias eram limpas, assim como cochos de água, ração e sal mineral, que também estavam presentes nos piquetes.

As colheitas de sêmen eram feitas em dois animais um garanhão Mangalarga, e em um jumento da raça Pêga, sendo que neste a colheita era realizada com o auxílio do manequim artificial, já no outro garanhão era utilizada uma égua no cio. As colheitas não eram realizadas frequentemente, mas sim de acordo com a necessidade de sêmen, evitando sempre dias consecutivos e horários onde a temperatura estivesse muito quente, por esse motivo a maior parte das colheitas eram feitas no final da tarde.

As éguas receptoras normalmente eram palpadas em dias alternados para se fazer o controle folicular e em alguns casos se houvesse necessidade a palpação era feita em dias seguidos. Já as éguas doadoras só entravam no manejo de palpações quando iniciava o programa de colheita de embriões de cada uma. Todas as éguas eram avaliadas quanto às características uterinas, ovarianas e a fase do ciclo estral em que estavam.

O horário de almoço se iniciava às 11horas e 30minutos, com retorno as 13horas 30minutos. As 16horas os animais que foram soltos pela manhã retornavam as baias e recebiam outra alimentação. E os animais que

necessitavam de medicação eram novamente medicados. A rotina dos funcionários era encerrada as 17horas.

Durante o período noturno alguns plantões para partos eram realizados pelos estagiários, de acordo a proximidade do parto de cada égua. A égua era avaliada a cada duas horas pelos estagiários, pois quando o parto ocorresse era necessário observar se o potro realizou sua primeira mamada, se eliminou o mecônio, se a égua expulsou a placenta por completo, e esta em alguns partos também era coletada, pesada e medida.

### **4.3. Atividades desenvolvidas na fazenda**

As principais atividades realizadas na fazenda foram citadas anteriormente e aqui serão descritas mais detalhadamente:

#### **4.3.1. Colheita de Sêmen**

Para colheita de sêmen na propriedade eram utilizados um garanhão da raça Mangalarga e um jumento da raça Pêga. Para a colheita do jumento era utilizado um manequim artificial e uma égua no cio do lado para estimulá-lo. Já como o Mangalarga não aceitava o manequim, a colheita era feita em uma égua no cio. Em ambos os casos os membros posteriores (quartela) das éguas eram contidos e caso fosse necessário um “cachimbo” também era utilizado, e todas ficavam no cabresto para evitar assim qualquer trauma gerado por coices e facilitar a monta.

A vagina artificial utilizada para a colheita era do modelo Botucatu, esta era montada previamente a chegada do garanhão. A água era aquecida a 52°C, para que no momento da colheita estivesse por volta de 42 a 45°C. Em seguida era colocada entre o tubo rígido e o flexível, a pressão era ajustada com ar.

Após a colheita o sêmen era levado ao laboratório armazenado em tubos de centrifugação de 50mL e diluído na concentração 1:1 com meio a base de leite em pó desnatado, glicose e bicarbonato de sódio.

Em seguida 1 microlitro de sêmen era diluído em 19 microlitros de água em outro recipiente, e esta diluição então era colocada na Câmara de Neubauer para analisar a concentração espermática da amostra, que era feita com o auxílio de um microscópio.

Para analisar vigor e motilidade uma gota de sêmen era colocada em uma lamina e cobeta por uma lamínula, ambas eram previamente aquecidas em uma placa de aquecimento. E leitura era realizada em microscópio óptico.

#### **4.3.2. Controle Folicular**

As éguas receptoras e doadoras passavam por uma rotina de palpação, sendo que para as receptoras a palpação era mais frequente, em dias alternados. Para auxiliar na palpação também era utilizado um ultrassom (Aloka SSD 500) que confirmava o que estava sendo palpado.

Os dados obtidos de cada égua eram então anotados em um caderno e posteriormente passados para uma ficha individual que cada receptora e doadora possuíam. As informações colhidas eram com relação a presença ou não de folículos em cada ovário, acompanhamento dos maiores folículos, presença e classificação do corpo lúteo. O tônus uterino também era verificado e classificado de 1 a 4 sendo que quanto maior o número, maior o tônus. Se havia edema, este era classificado de 0 a 3, presença de fluido que era classificado de acordo com quantidade T (traços), S (small), M (médium), e L (large) e característica do fluido 1 a 4 sendo 1 um líquido hiperecótico e 4 anecótico.

As éguas que apresentavam folículos de tamanho significativo, maiores que 35mm e edema uterino 3, era feita a indução de sua ovulação. Se a égua estivesse no seu primeiro ciclo após o período de transição, a indução era feita com a utilização de 1.666 UI via intravenosa de Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG), pois estas éguas poderiam não possuir os níveis mínimos de LH na hipófise. O hCG tem como função se ligar aos receptores de LH induzindo a ovulação. Porém o hCG não era utilizado para a indução duas vezes seguidas, devido ao inconveniente desde promover a formação de anticorpos após injeções sucessivas.

Nas éguas que já tiveram outros ciclos, ou já havia sido utilizado o hCG no ciclo anterior, 1mg de Deslorelina era adotado no protocolo de indução, onde esta atuava como um análogo ao Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), estimulando a liberação de LH reduzindo a duração do estro.

As éguas que se encontravam em anestro ou em período de transição também poderiam ser utilizadas como receptoras, e o protocolo utilizado para tal finalidade era a aplicação de 5mL de progesterona, sendo a primeira aplicação considerada como D0, isso se a égua apresentasse edema uterino, que indica que o útero foi exposto ao estrógeno e, portanto possui receptores para progesterona. Se isto não fosse constatado era feito a aplicação de 10mL benzoato de estradiol, e se a égua apresentasse a formação de edema, poderia então ser feita a aplicação da progesterona, que deve continuar a ser aplicada até os 100 dias de gestação. Este método não era muito utilizado na fazenda devido ao custo ser muito superior aos outros procedimentos.

#### **4.3.3. Inseminação Artificial**

Para o procedimento da inseminação artificial, era escolhida a égua com melhor condição para receber o sêmen. Esta era colocada no brete anexo ao laboratório. A cauda era enfaixada e amarrada na lateral de seu corpo. Feito isso era realizada uma higienização, com 3 lavagens usando água e sabão líquido.

Normalmente era utilizado sêmen fresco ou refrigerado e mais raramente o congelado.

O procedimento de inseminação era feito com o auxílio de uma pipeta de inseminação, que era introduzida até passar pela cervix, onde o sêmen era depositado.

#### **4.3.4. Colheita de Embrião**

O método adotado na fazenda para a colheita do embrião era o transcervical, utilizando um sistema aberto de uma só via com cateter de colheita

de silicone de 32mm, com um filtro na ponta, sendo o fluxo controlado por uma pinça atraumática. Para a realização do lavado o líquido utilizado era o Ringer Lactato. A quantidade que era infundida dependia de cada égua, de acordo com o tamanho do útero, normalmente de 1litro a 1,5 litros.

Costumeiramente eram realizadas 3 lavagens, mas dependendo de como estava o lavado, eram realizadas mais. Após o termino dos lavados o líquido que sobrou no filtro era levado para uma placa de petri, e com o auxílio de uma lupa o embrião era procurado.

Ao se localizar o embrião este era levado para outra placa de petri com 10 gotas de TQC *holging* um meio de manutenção de embriões onde então era lavado, passando de gota em gota. Após esse procedimento o embrião era classificado de acordo com o seu desenvolvimento.

#### **4.3.5. Inovulação**

O processo de inovulação era feito através do auxílio de um inovulador francês, para palhetas de 0,25 ou 0,5. Estes embriões normalmente eram da própria fazenda ou outro médico veterinário de fora levava o embrião e fazia a inovulação, em uma receptora previamente escolhida em condições ideais para receber um embrião.

#### **4.3.6. Acompanhamentos de Partos e dos potros**

As éguas que estavam próximas a data de parto eram acompanhadas no período noturno pelos estagiários, em plantões realizados de 2 em 2 horas. Para certificar que o parto ocorresse de forma tranquila, o potro mamasse o colostro e que a égua expulsasse toda a placenta.

Assim que o potro dava a primeira mamada, era então feita a cura do umbigo com iodo 5% para evitar contaminações, e esse processo era repetido até que o umbigo estivesse seco. Quando chegava nesse estágio era então utilizado Vetaglós até que o umbigo estivesse completamente cicatrizado.

Os potros eram observados diariamente, e por volta do sétimo dia, estes apresentavam a diarreia do cio do potro, se esta se mantivesse por um tempo prolongado era fornecido ao potro probiótico e peptozil até a diarreia diminuir. Normalmente após essa fase os potros não apresentavam maiores problemas.

#### **4.3.7. Clínica**

Na fazenda havia poucos casos clínicos, os mais relevantes foram uma contaminação por *Rodococcus* em alguns animais, laminite, um surto de conjuntivite, linfangite, cólica e pequenos ferimentos que os animais sofriam no dia a dia.

#### **4.4. Conclusão**

O estágio realizado na Fazenda Santa Rita, uma central de reprodução renomada, me ofereceu a oportunidade de vivenciar e aprender um pouco da realidade de uma central, seus desafios e recompensas. Proporcionando-me a possibilidade de ser uma profissional mais completa e preparada ao finalizar o curso de medicina veterinária.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive Technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animal**, v.40, p.310-329, 2005.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, 32, (6) p. 541-45, 2000.

ALVARENGA, M. A. **Melhoria na congelação de sêmen de garanhões e das variações raciais com o uso da Dimethyl-formamida**. 2002. 88 f. Tese (Livredocência) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2002.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion sêmen: A review. **Animal Reproduction Science**, v.89, n. 1-4, p.105-113, 2005.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal Supl.**, Belo Horizonte, n.6, p.204-209, dez. 2009.

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

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal funcion. In: MCKINNON, A. O.: VOSS, J. L.: **Equine Reproduction**, Filadelfia: Lea & Febiger, p. 715-745. 1992.

AMANN RP, GRAHAM JK. Spermatozoal function. *In*: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.715-745.

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

ARRUDA, A.P.; VIEIRA, R.C.; BARBOSA, R.T.. Congelação do sêmen de jumentos: características reprodutivas de um doador. **Revista Brasileira Reprodução Animal Supl.**; v.1, p.215-1, 1989.

ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; ALENCAR, M.M.; BARNABE, R.C. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lente e rápida de termo-resistência: efeitos

sobre a fertilidade. **Brasilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 1, p. 131-137, 1992.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Science Veterinariae**, v. 31 (Suplemento), p.226-227, 2003.

ARRUDA, R.P.; CELEGNINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; GARCIA, A.R.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. SOUSA, L.W.O. **Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. Biotecnologia da Reprodução em bovinos.** SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 1. **Anais**. p. 166-179. 2004.

ARRUDA RP, CELEGHINI ECC, SOUZA LWO, NASCIMENTO J, ANDRADE AFC, RAPHAEL CF, GARCIA AR. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Sci Vet**, v.33, supl.1, p.145-150, 2005.

ASHWOOD-SMITH, M.J. Mechanisms of cryoprotectant action. In: BOWLER, K., FULLER, B.J. **Temperature and Animal Cells**. Cambridge: Biologists, 1987, p.395 –406.

AURICH C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.65-75, 2005.

BARRETO, M. A. P.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B.; CAIADO, J. R. C.; SOUZA, G. V.; SHIMOYA, A.. Efeito de proteínas do plasma seminal equino com massa superior a 10 kDa concentradas 10 vezes sobre a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n. 12, p. 2115-2119, 2008.

BERTOL, M. A. F. **Estágio curricular supervisionado em reprodução animal.** Trabalho apresentado para conclusão de curso de medicina veterinária da Universidade Federal do Paraná. 2009.

BICUDO, S.D.; AZEVEDO, H.C.; MAIA, S.M.; GREEN, R.E.; RODELLO, L.; MEIRA, C. Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 (Supl. 3): s787-s798, 2007.

BOE-HANSEN GB, ERSBOLL AK, GREVE T, CHRISTENSEN P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. **Theriogenology**, v.63, p.2006-2019, 2005.

BRANDÃO, A. C. **Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide criopreservados de equinos.** Tese apresentada ao programa de pós graduação em reprodução animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008.

BRINSKO, S.P. et al. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1641-1655, 1999.

BRITO LFC. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clin Techn Equine Pract.** v.6, p.249-264, 2007.

BRUEMMER, J. E. **Collection and freezing of epididymal stallion sperm.** Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 2006; 22:677-82.

CARMO, M. T.; PAPA, F. O.; MEDEIROS, A. S. L. et al. Improvement os stallion sêmen post-thaw motility with the association dimethyl formamide. **Animal Reproduction Science Abstracts**, v. 89, n. 1-4, p. 286, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CHENG FP, GADELLA BM, VOORHOUT WF, FAZELI A, BEVERS MM, COLENBRANDER B. Progesterone induced acrossome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. **Biol Reprod**, v.59, p.733-742, 1998.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.

COOPER, G.M. **The cell: a molecular approach.** 1 ed, ASN Press: Washington, 1996, 673p.

CRISTANELLI, M. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. *et al.* Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. **Theriogenology**, v.22, n.1, p. 39-45, 1984.

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

DARENIUS A. Experiences with chilled, transported equine semen. *In*: Stallion Reproduction Symposium, 1998. **Proceedings...** Montgomery, AL: **Society for Theriogenology, American Association of Equine Practitioners**, 1998. p.60-70.

DARNNEL, J.; LODISH, H.; BALTIOMORE, D. Active transport of ions and ATP hydrolysis. *In*: DARNNEL, J.; LODISH, H.; BALTIOMORE, D. (Ed) **Molecular cell biology.** New York: Scientific American Books, 1986. P.625-628.

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

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

DELL' AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F.O., Efeito de diluentes e da intensidade e tempo de centrifugação, sobre os parâmetros espermáticos para congelação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 25, .n.3, p. 460-462, 2001 .

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.A. Field study of the fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v. 22, p. 291 - 303, 1984.

EHRENWALD E, FOOTE RH, PARKS JE. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. **Mol Reprod Dev**, v.25, p.195-204, 1990.

FOULKES JA. The separation of lipoproteins from egg yolks and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. **J Reprod Fertil**, v.49, p.277-284, 1977.

FÜRST, R.; CARVALHO, G. R.; FÜRST, M. C. O.; RUAS, J. R. M.; BORGES, A. M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v57, n.5, p. 599-607, 2005.

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

GADELLA, B. M. *et al.* Capacitation and the acrossome reaction in equine sperm. **Anim. Reprod. Sci**, v.68, p. 249-265, 2001.

GARDE, J.; AGUADO, M.; PEREZ, S.; GARRIDO, D.; PEREZ-GUZMAN, M.; MONTORO, V. **Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams**. *Theriogenology*. 1994; 41:2003.

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A. *et al.* Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biol. Reprod.**, v.34, p.127-38, 1986.

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

GOMES, G. M.; JACOB, J. C. F.; MEDEIROS, A. S. L. *et al.* Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Machador breed. **Theriogenology**, v.58, n.2-4, p.277-299, 2002.

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

GRAHAM J. Assessment of sperm quality. In: **International Symposium on Stallion Reproduction**, 3, 2001, Fort Collins. **Proceedings...** Fort Collins: ISSR, 2001. p.23. Resumo.

GRANEMANN, L. C. **Avaliação comparativa do sêmen equino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia**. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em ciências veterinárias, Universidade Federal do Paraná. 2006.

GUERRERO, C. A. **Cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection with bovine epididymal spermatozoa**. [Tese]. Baton Rouge: Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College; 2006.

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L. Factors affecting motion characteristic of frozen-thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v.28, p.47-53, 1996.

HOCHACHKA, P. W.; **Maintaining coupled metabolism-membrane functions in hypoxia adaptation of diving mammals**. *FASEB J* 46(6): 22382238, May 1, 1987.

HOLT, W. V. Membrane heterogeneity in mammalian spermatozoon. **International review of cytology**, v.87, p.159-194, 1984.

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

HUGUES, J.P. Curso de Eqüinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte : CBRA, 1991.

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

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

JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VER, H. H.; ZANEVELD, L. J. D. The hypoosmotic swelling test: an update. **Arch. Of Androl.**, v.29, p.105-116, 1992.

JONDET, M.; DOMINIQUE, S.; SCHOLLER, R. Effects of freezing and thawing on mammalian oocyte. **Cryobiology**, v.21, p.192-199, 1984.

JONDET, R. **Contributin a l' amelioration de la technologie du sperme de taureau**. Rennes, 1980. 166 f These (Docteur)- UER de Sciences Biologiques, Université de Rennes.

KEITH, S.L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine**

**spermatozoa**. 1998. P.116. Dissertação (Doutorado) – Colorado State University.

KENNEY, R. M. et al. **Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings**. In: ANNUAL CONVENTION, AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 1975. **Proceedings...** Boston: AAEP, 1975. v. 21, p. 327-335.

LIMA, R. A. S.; OLIVEIRA, R. A. MENDES, C. Q.; JÚNIOR, P. G. **Perfil e Tendências da Equideocultura Brasileira**. Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. A produção animal no mundo em transformação. Brasília, 23 a 26 de julho de 2012.

LIPAR JL, KETTERSON ED, NOLAN VJR, CASTO JM. Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. **Gen Comp Endocrinol**, v.115, p.220-227, 1999.

LOVE, C. C.; LOCH, W. L.; BRISTON, F.; GARCIA, C.; KENNY, R. M. Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging methods. **Theriogenology**, v.31, n.3, p.613-622, 1989.

LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. The relationship between chromatin quality and fertility of chilled stallion sperm. In: **American Association Equine Practitioners**, 47, 2001, San Diego. **Proceedings...** San Diego. p.229-231.

MARTIM, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**. Suppl. 27, p 47-51, 1979.

MARTINEZ-PASTOR, F.; MACIAS, V.G.; ALVAREZ, M.; CHAMORRO, C.; HERRAEZ, P.; PAZ, P.; ANEL, L. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. **Theriogenology**, v.65, p.471-485, 2006.

MAZUR, P. Cryobiology: The freezing of biological systems. **Science**, v.199, p.939- 949, 1970.

MAZUR, P. Basic concepts in freezing cell. In: Deep freezing of boar semen, 1985, Uppsala. **Proceedings**. Uppsala, 1985, p.199- 222.

MCDONNELL, S.M., LOVE, C.C., 1991. **Xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions**. *Theriogenology* 36, 73–76.

MCDONNELL, S. M. **Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions**. Equine Behavior Laboratory, New Bolton Center, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, 382 West Street Road, Kennett Square, Pennsylvania, PA 19348, USA. *Animal Reproduction Science* 68 (2001) 153–159

McGANN, L. E. Differing actions of penetrating and non penetrating cryoprotecture agents. **Cryobiology**, v.15, p.382-390, 1978.

MCKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. **Australian Equine Veterinarian**, v. 14, n. 4, p. 156-174, 1996.

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

MEDEIROS, A.S.L. et al. Avaliação da integridade acrossomal de espermatozoides de garanhões criopreservados com crioprotetores a base de amidas e glicerol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, 2003.

MELO, M.I.V; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.51, p.71-78, 1999.

MERKT, H. **Exame andrológico e problemas de cobertura no garanhão.** Esquema para o exame andrológico. In: ENCONTRO NACIONAL DE EQÜIDEOCULTURA, 4, 1986, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo : Sociedade Brasileira de Hipologia, 1986. p.33-34.

MERYMAN, H. R.; WILLIAMS, R. J.; DOUGLAS, M. S. J. Freezing injury from solution effects and its prevention by natural or artificial cryoprotection. **Cryobiology**, v.14, p.287-302, 1977.

MONTEIRO, G. A.; GUAISTI, P. N.; PAPA, F. O. Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperadas da cauda do epidídimo. **Veterinária e Zootecnia**, p.448-458, v.16, n.3, set, 2009.

MORRIS, L. H. A. *et al.* Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **J. Reprod. Fertil**, v.118, p. 95-100, 2000.

MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on kinematics of frozen thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p. 285-291, 2004.

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E. K.; GADELLA, B. M. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma and acrossome membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction**, v. 68, p.1835, 2003.

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia e epifluorescência) de espermatozoides eqüinos criopreservados.** 2006. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade de São Paulo.

NEILD DN, GADELLA BM, AGÜERO A, STOUT TAE, COLENBRANDER, B. Capacitation, acrosome function and chromatin structure in stallion sperm. **Anim. Reprod. Sci.**, v.89, p.47-56, 2005.

PARINAUD, J. et al. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit©) following ejaculation. **Human Reproduction**, v. 12, p. 243 - 246, 1997.

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

PICKETT, B. W.; MARTIG, R. C.; COWAN, W. A. Preservation of bovine spermatozoa at -79 and 198°C. **J. Dairy. Sci.**, v.44, p.2089-96, 1961

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia Lea e Febiger, 1993. P. 769-789.

PINTO, P. A.; SANTOS, A. E.; VALE FILHO, V. R. *et al.* Tecnologia de sêmen-teste de termorresistência de sêmen bovino, utilizando-se animais *Bos taurus* e *Bos indicus*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE VETERINÁRIOS DE LÍNGUA PORTUGUESA, 1., 1978, São Paulo, **Anais...** São Paulo, 1978, p. 77.

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, p. 215-225, 2006.

REECE, W. O. **Fisiologia de animais domésticos**, 1ª Ed., São Paulo, Roca, p. 261-279, 1996.

ROWLEY, D.D., LOCK, T.F., SHIPLEY, C.F., 1999. **Fertility of detomidine HCl induced ex copula ejaculated stallion semen**. Proc. AAEP 45, 221–223.

SAMPER, J. C. Techniques for artificial insemination. In: YOUNGQUIST, R. S.; THREFFALL, W. R. **Current therapy in large animal theriogenology**. 2nd ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 37-42.

SAMPER, J. C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**-Philadelphia, USA: W.B.Saunders, 2 nd ed, 2009. 336p.

SEIDEL, G. E. **Principles of cryopreservation of mammalian embryos**. In: TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS: SHORT COURSE PROCEEDINGS, 1986, Fort Collins. **Proceedings...**Fort Collins: Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, 1986, p.6-12.

SHRIVASTAV, P.; NADKARNI, P.; WENSVOORT, S. **Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azzospermia**. Hum. Reprod. 1994; 9:2058-61.

SILBER, S. J.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. **Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration**. Hum. Reprod. 1994; 1905-9.

SILVA FILHO, J. M. **Aspects of the reproductive handling and of the semen in the artificial insemination in mares.** 1994. 402 f. Thesis (Doctor Scientiae) – Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1994.

SILVA FILHO, J.M.; VALLE,G.R.;VIANA,W.S.; VIANNA, L.R.; PALHARES, M.S. Utilização de manequim para coleta de sêmen eqüino e sua influência sobre características reprodutivas do garanhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**.vol.51 no.5, 1999.

SMITH, J. F.; MURRAY, G. R. Evaluation of different techniques for determination of membrane status in spermatozoa. Staining techniques in spermatozoa. **Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.**, v.57, p.246-250, 1997.

SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.3, n.2, p. 53-63, jun. 2009.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J. **Cooled and frozen Stallion Semen.** Fort Collins: Colorado State University. 1999, 80 p. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin, N. 9).

SULLIVAN, J.J., TURNER, p.C.; SELF, L.C., et al. Survey of reproductive efficiency in the quarter horse and thoroughbred. **J Reprod Fertil**, Supl.23, p.315-318, 1975.

TEMPE-SMITH, P. D.; SOUTHWICK, G. J.; YATES, C. A.; TROUNSON, A. O.; KRETZER, D. M. **Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis.** J In Vitro Fertil Embryo Transf. 1985; 2:119-22.

TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 27, p. 53-59, 1979.

TÖPFER-PETERSEN E, EKHLASI-HUNDRIESER M, KIRCHOFF C, LEEB T, SIEME H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.159-170, 2005.

VARNER DD. Technical considerations for cool transported equine semen. *In: Congresso Nazionale Multisala Sive*, 9, 2003, Pisa. **Proceedings...** 7p.

VASQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hyposmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p.913-922, 1997.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIDAMENT, M; DUPERE, C.; YVON, J. M. *et al.* Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v.48, p.907-917, 1997.

VIDAMENT, M. French field results (1985 – 2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p.115-136, 2005.

VOSS, J.L. Breeding Efficiency. In: McKINNOW, A.O., VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Phyladelphia : Lea & Febiger. 1993. 1114p.

WARING, G.H. **Horse behavior-** NY-EUA: William Andrew Publishing, 2003. p 163, 173,174.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In MORRIS, G. J. & CLARKE, A. **Effects of low temperatures on biological membranes**. New York Academic Press, p. 189-218, 1981.

WATSON, P. F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction and fertility development**, v.7, p.871-891, 1995.

WILHELM, K. M.; GRAHAN, J. K.; SQUIRES, E. L. Comparision of the fertility of cryopreserved stallion sperm with sperm motion analysis, flow cytometric evaluation, and zona- free hamster oocyte penetration. **Theriogenology**, v.46, p. 559-578,1996.

YANAGUIMACHI, R. In. E. KNOBIL, J. D. NEILL (Eds.), **The Physiology of Reproduction**, Raven Press, New York, p. 189-317, 1994.

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

ZÚCCARI CESN. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. 1998. 121f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho (UNES), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 1998.

## ANEXOS

Causas	Consequências
Coleta de sêmen e diluição	Proteínas seminais são adicionadas ao sptz, estimulam a motilidade
Centrifugação	Viabilidade espermática depende das condições de centrifugação
Adição de leite, gema de ovo e glicerol (GLI)	Estresse osmótico passageiro; células rapidamente desidratam e então lentamente retomam o volume normal enquanto GLI se interioriza na célula
Refrigeração a 5º C	Ocorrem mudanças nas membranas que podem resultar em choque térmico e/ou danos de refrigeração às membranas
Congelação celular (remoção de água do sistema em forma de gelo)	Mudanças osmóticas (perda de água) causa desidratação celular e podem resultar em danos osmóticos; redução na temperatura pode causar danos de refrigeração, formação de cristais de gelo e danos à célula
Estocagem em Nitrogênio (N <sub>2</sub> ) líquido	Células devem permanecer nos canais não congelados
Descongelação (retorno da água a sua forma líquida)	Mudanças osmóticas (“adição de água”) restaura o volume celular, danos de recristalização, danos osmóticos
Remoção do GLI (retirada do GLI antes da IA ou só IA)	Desequilíbrio passageiro de osmolaridade, célula rapidamente aumenta seu tamanho e então vagarosamente retorna ao volume original conforme o GLI deixa a célula, pode ser muito lesivo

**Anexo 1 - Principais causas e consequências das injúrias antes, durante e após a criopreservação nas células espermáticas.**

Fonte: (Adaptado de Graham, 1996).