

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO: COMPARAÇÃO DA GEMA DE
OVO DE EMA (*Rhea americana*) COM A GEMA DE OVO DE GALINHA.

Liana de Salles van der Linden

PORTO ALEGRE
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO: COMPARAÇÃO DA GEMA DE
OVO DE EMA (*Rhea americana*) COM A GEMA DE OVO DE GALINHA

Liana de Salles van der Linden

Dissertação apresentada
como requisito parcial para
obtenção do grau de
Mestre em Medicina Animal: Equinos

Orientador: Adriana Pires Neves
Co-orientador: Ivan Cunha Bustamante Filho

PORTO ALEGRE
2012

Liana de Salles van der Linden

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO: COMPARAÇÃO DA GEMA DE OVO DE EMA (*Rhea americana*) COM A GEMA DE OVO DE GALINHA.

APROVADO POR:

Profa. Dra. Adriana Pires Neves

Profa. Dra. Magda Jochims Vieira

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky

Profa. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin

CIP - Catalogação na Publicação

van der Linden, Liana de Salles

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO: COMPARAÇÃO DA GEMA DE OVO DE EMA (Rhea americana) COM A GEMA DE OVO DE GALINHA. / Liana de Salles van der Linden. - - 2012.

62 f.

Orientadora: Adriana Pires Neves.

Coorientador: Ivan da Cunha Bustamante Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. criopreservação. 2. sêmen equino. 3. gema de ovo. I. Neves, Adriana Pires, orient. II. Bustamante Filho, Ivan da Cunha, coorient. III. Título.

Dedico este trabalho aos cavalos
que são minha paixão e minha inspiração

Agradecimentos

A Prof^a Dr^a Adriana Pires Neves, pela sua orientação sua amizade e por acreditar no meu trabalho.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho, pela amizade, e pelo inestimável apoio na análise estatística.

Aos funcionários da Unipampa, em nome da Cintia Saydelles da Rosa pelo companherismo e cooperação neste trabalho.

Aos meus pais, Julio van der Linden e Rosa Alice de Salles, pelo amor e confiança.

À Flavia Seligman, por sempre me dar apoio e força em minhas decisões.

Aos meus irmãos Gabriela, Leo e Clarice pelo carinho e amizade.

Aos meus colegas, Murilo, Henrique e Thomás pela ajuda e amizade.

Aos proprietários e funcionários das cabanhas: Viragro A Tala, em nome do Dr. Gilberto Loureiro de Souza, Santa Anna, em nome do Dr. Edmundo Torres e M.V. Diego Torres, e Dom Marcelino em nome do Sr. Marcelo Silva por contribuírem disponibilizando seus animais para a realização deste trabalho.

Às minhas amigas, Carol, Livinha, Paty, Laura e Vanessa que muito reclamaram da minha ausência mas souberam entender.

À central de congelamento de sêmen bovino Progen e sua equipe pela ajuda inestimável.

Ao tio Olavo, e ao Juneco pelo apoio com material.

À Plantel Inseminação, se propriedade do Sr. Aécio Rodrigues pela importante contribuição para execução deste trabalho.

Aos alunos bolsistas da Unipampa, Santiago Schiavo e Márcio Maciel, e ao Gilberto Severo, estagiário da UFPel pela cooperação e companherismo no desenvolvimento deste trabalho.

The Horse's Prayer
(*unknown*)

Feed me, water and care for me, and when the day's
work is done, provide me with a shelter, a clean dry
stall large enough for me to lie down in comfort.

Talk to me, your voice often means as much to me
as the reins. Pet me sometimes that I may serve you
more gladly and learn to love you. Shoe me properly
that I may serve you in comfort. Never strike, beat
or kick me when I don't understand what you want,
but give me the chance to understand you.

And finally oh master, when my youthful strength
is gone do not turn me out to starve or freeze, or sell
me to some cruel owner to be slowly tortured or
stoned to death, but do thou, my master take my life
in the kindest way, and your God will reward you
here and hereafter.

You will not consider me irreverent if I ask this in
the name of Him who was born in a stable

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi comparar a utilização de diluentes comerciais à base de gema de ovo de galinha com os mesmos diluentes, nos quais se substituiu a gema de galinha pela de ovo de ema (*Rhea americana*). Foram utilizados Seis garanhões da raça Crioula, comprovadamente férteis e no período fora da estação de monta e utilizados seis ejaculados de cada garanhão. O sêmen foi avaliado macroscopicamente quanto ao volume, aspecto e coloração, a seguir avaliou-se a motilidade progressiva e total. Posteriormente o sêmen foi dividido em quatro alíquotas e diluído na proporção 1:1 com o diluente, Equimix (Nutricell Nutrientes Celulares) para centrifugação. Para adição do diluente de congelamento foram utilizados: diluente A (FR-5, Nutricell Nutrientes Celulares) e diluente B (Botu-crio, Biotech Botucatu S.A.) adicionados de 20 % de gema de ovo de ema, ou de 20 % de gema de ovo de galinha. As amostras foram envasadas, identificadas e submetidas a congelamento conforme o protocolo. As palhetas foram descongeladas, após um período mínimo de 7 dias e examinadas para os seguintes quesitos: motilidade total e progressiva, e integridade física e funcional da membrana plasmática do espermatozoide. Os diluentes comerciais com ou sem adição de gema de ovo de ema não apresentaram diferenças em relação à motilidade total e progressiva, porém observou-se diferença nos parâmetros quando comparados os diluentes comerciais. Houve diferença na funcionalidade da membrana apenas quando comparado diluente A e B com gema de ovo de ema. No quesito integridade de membrana não foi observado diferença estatística. Estes resultados demonstram que a gema de ovo de ema (*Rhea americana*) pode ser uma alternativa para produção de diluentes para congelamento de sêmen de equinos.

Palavras – chave: criopreservação, sêmen equino, gema de ovo, ema.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the use of two commercial extenders using chicken egg yolk with the same extenders, to which rhea (*Rhea americana*) egg yolk was added. Six Criollo breed stallions were used during the off-breeding season period. Six collections per stallion were used. The ejaculate aspect, total and progressive motility were evaluated with a microscope; concentration was determined with a Neubauer counting chamber. After evaluation, semen samples were divided in two aliquots and diluted 1:1 in each of the centrifugation extender Equimix (Nutricell Nutrientes Celulares). For freeze that semen we used two commercial extenders: A (extender with glycerol) or B (extender with methylformamide) and was added 20% rhea egg yolk or 20% chicken egg yolk. Semen samples were examined at least 1 week after freezing, for total and progressive motility, physical and functional membrane integrity (HOST test and CFDA-PI fluorescence) (Lagares et al. 1998; Harrison & Vickers, 1990). The extenders of a given brand with or without rhea egg yolk had no significant difference according to total and progressive motility, although there was difference ($p = 0,05$) between extenders when different brands were compared, no matter if they were added Rhea egg yolk or not. Membrane functionality showed difference only when compared Extender A and B with Rhea egg yolk. Membrane integrity had no significant difference between all the treatments. These results show that Rhea egg yolk might be an alternative to making an equine semen extender.

Keywords: cryopreservation, equine semen, egg yolk.

Lista de Ilustrações

Figura 1- Morfologia do espermatozóide equino.....	17
Figura 2- Efeito do diluente e tipo de gema de ovo na motilidade total e progressiva de sêmen equino criopreservado.....	43
Figura 3- Efeito do diluente e tipo de gema de ovo na função e integridade da membrana em sêmen criopreservado equino.....	46

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Perfil lipidico das gemas de galinha e ema (mg/g).....	33
Tabela 2- Características seminais pré e pós-descongelamento dos garanhões submetidos ao teste de congelamento.....	41
Tabela 3 – Características do sêmen fresco dos garanhões submetidos a criopreservação.....	44
Tabela 4- Características do sêmen pós descongelamento.....	45

Lista de Abreviaturas

GPC : glicerilfosforilcolina

HOST: teste hiposmótico

CFDA: carboxifluoresceína

IP: iodeto de propídio

IA: inseminação artificial

LDL: lipoproteínas de baixa densidade

NTE: número total de espermatozóides

MT: motilidade total

MP: motilidade progressiva

PUFA: ácidos graxos polinsaturados

SFA: ácidos graxos saturados

ROS: espécies reativas de oxigênio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 O espermatozóide.....	16
2.2 Princípios da criopreservação.....	20
2.3 Procedimentos utilizados na criopreservação do sêmen equino.	23
2.4 Criocapacitação.....	28
2.5 O colesterol.....	29
2.6 A utilização da gema de ovo na criopreservação de sêmen.....	31
2.7 Avaliação Espermática.....	33
3 ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO.....	36
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
5 REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A indústria do cavalo no mundo exerce um importante papel como fonte de empregos e de renda. No Brasil, o rebanho de equinos no ano de 2004 estava constituído por 5.787.250 cabeças. Neste mesmo ano o faturamento de vendas em leilões foi em torno de 2.058.202.871. A indústria de medicamentos e suplementos movimentou cerca de R\$ 54.142.630,20 e o mercado de rações para equinos, R\$ 53.440.000,00 anualmente (SOUZA LIMA et.al., 2006).

As biotecnologias na reprodução têm importante papel na produção animal, especialmente como instrumentos aplicados ao melhoramento genético. Na espécie equina, a inseminação artificial (IA) é mundialmente utilizada, sendo a biotecnologia com maior impacto sobre a reprodução eqüina, pois um garanhão pode deixar centenas de descendentes durante a vida se IA for usada de forma eficiente. A modalidade mais frequentemente utilizada é o resfriamento do sêmen e transporte para o local onde a égua está alojada (LOOMIS, 2006).

As diversas vantagens e praticidade da IA permitiu sua rápida expansão e disseminação. Dentre os diversos benefícios de seu uso destacam-se:

- a utilização de garanhões de genética superior em um maior número de éguas;
- assegurar avaliações e monitoramento do sêmen, permitindo detecção imediata de problemas, e início do tratamento antes que ocorram perdas reprodutivas;
- o aumento do potencial reprodutivo de garanhões subfêrteis, possibilitando tratamentos como filtragem, centrifugação ou diluição em meios que melhorem os índices de fertilidade destes reprodutores;
- permitir a cobertura de éguas problema que não podem ser cobertas por monta natural, como éguas debilitadas, com laminite, problemas de navicular, entre outros casos; eliminação das barreiras geográficas;
- permitir a utilização de sêmen congelado; aumento do numero de éguas cobertas por garanhão;

- permitir a utilização de garanhões que estão em treinamento; auxilia na preservação de raças raras; permite melhor controle de doenças sexualmente transmissíveis;
- reduzir os riscos de acidentes; e ainda permitir a utilização de garanhões lesionados (DAVIES MOREL, 1999).

A fertilidade de um rebanho depende diretamente da qualidade do sêmen utilizado na IA. Love et al. (2005) citam que a baixa qualidade seminal contribui para a redução dos índices de fertilidade, além de que o manejo inadequado das éguas pode ser responsável pelas baixas taxas de prenhez. Os fatores ambientais também devem ser considerados ao se avaliar a eficiência reprodutiva dos animais (PICKETT E SHINER, 1994).

A IA com sêmen congelado ainda tem questões técnicas a serem solucionadas, como a variação individual frente à criopreservação, o baixo rendimento de doses por ejaculado, o intenso manejo das éguas durante as inseminações, maior custo por prenhez, além da grande oscilação das taxas de prenhez em relação às obtidas com Monta Natural (MN) ou IA com sêmen a fresco ou refrigerado (BALL, 1998; BACKMAN et al., 2004). A criopreservação do sêmen equino representa importante instrumento no melhoramento genético da espécie pela padronização do uso de bons reprodutores. Diversas associações de raças no Brasil já permitem a utilização de sêmen congelado equino, entre elas a de Quarto de Milha, raças de salto, Campolina, Mangalarga Paulista, Mangalarga Marchador. A associação brasileira que mais recentemente liberou a utilização de sêmen congelado foi a da raça Crioula (ABCCC,2011).

Nessa pesquisa comparou-se o efeito da gema de ovo de galinha e de ema (*Rhea americana*) sobre parâmetros espermáticos de sêmen equino congelado com dois diluentes comerciais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O espermatozóide:

Os espermatozóides (figura 1) são células alongadas consistindo de uma cabeça, peça intermediária (colo) e cauda (GADELLA et. al., 2001). A cabeça possui forma oval e achatada e acomoda o núcleo, uma estrutura que contém cromatina altamente condensada. O acrossoma é uma estrutura de parede dupla situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, derivada do Golgi gerado durante a espermiogênese. O acrossoma possui enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fecundação e oferece proteção ao DNA contra choques mecânicos (EDDY E O'BRIEN, 1994; HAFEZ, 1995). Esta estrutura envolve dois terços do núcleo; nessa região encontram-se cinco membranas: a membrana plasmática, as membranas acrossomais externa e interna e as membranas nucleares externa e interna (CHRISTENSEN, 1995). As membranas plasmáticas e acrossomal de espermatozóides de diferentes espécies possuem diferentes composições lipídicas, estando relacionadas com a capacidade do espermatozóide de suportar mudanças que ocorrem na bicamada lipídica durante a redução da temperatura (AMANN, 1991). Toda a característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóide para o oócito, onde ocorre a união dos pronúcleos masculino e feminino, produzindo o zigoto (EDDY E O'BRIEN, 1994). Portanto, a função principal da cabeça do espermatozóide é armazenamento e liberação do genoma para o oócito; enquanto a da cauda é promover a motilidade da célula para permitir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e a penetração através da zona pelúcida do oócito (MORTIMER et al., 1997).

O colo conecta a cabeça do espermatozóide à cauda, que é subdividida em peça intermediária, principal e terminal, todas envolvidas por uma membrana plasmática comum (HAFEZ, 1995). O colo ou peça intermediária forma uma placa que se ajusta dentro de uma depressão na superfície do núcleo (EDDY E O'BRIEN, 1994) e é contínua com nove feixes de fibras que posteriormente se projetam através da maior parte da cauda. A peça

intermediária, localizada entre o colo e o *annulus*, juntamente com o comprimento total da cauda, formam o axonema (HAFEZ, 1995). Na peça intermediária, dispostas helicoidalmente estão as mitocôndrias (entre 75 a 100 aproximadamente), possuindo a função de produzir a energia necessária para a motilidade espermática (EDDY E O'BRIEN, 1994). Na região da peça intermediária, essas estruturas ainda são envolvidas pela bainha mitocondrial. As mitocôndrias presentes nesta estrutura são responsáveis pelo suprimento de energia requerida nos processos celulares, principalmente para o início e manutenção da motilidade (VARNER et al., 1991). As mitocôndrias de espermatozoides de diferentes espécies parecem ser semelhantes e bastante resistentes a vários tipos de lesões, porém, a crista mitocondrial pode ser severamente danificada caso os espermatozoides sejam submetidos à criopreservação sem que ocorra uma desidratação mínima, ou na ausência de um agente crioprotetor intracelular, como por exemplo, o glicerol (AMANN, 1991)

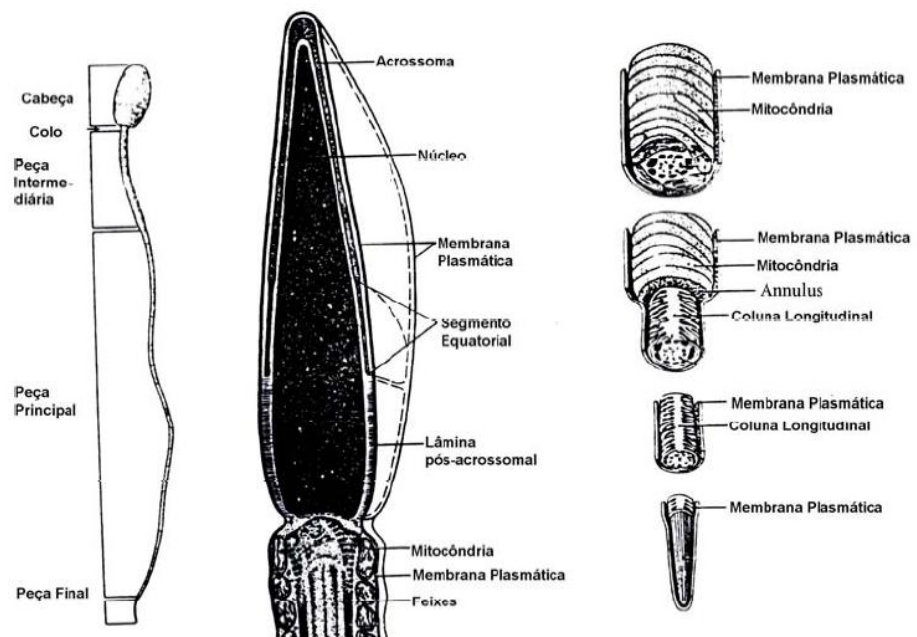


Figura 1 – Morfologia do espermatozoide equino. Adaptado de AMANN E PICKETT (1987)

O axonema é uma estrutura complexa composta por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina (ALBERTS, 2004), e está envolvido no mecanismo de motilidade espermática. É composto por um par de microtúbulos

central e nove pares de microtúbulos periféricos circundados pelas fibras externas densas. A membrana plasmática engloba a célula, envolve todas as estruturas espermáticas, define os seus limites e mantém as diferenças entre o citosol e o ambiente extracelular (AMANN E GRAHAM, 1992; ALBERTS et al., 2004). É composta de moléculas lipídicas e protéicas (proteínas integrais ou intrínsecas e periféricas), unidas principalmente por ligações não-covalentes. A bicamada lipídica ficou estabelecida definitivamente como a base universal da estrutura das membranas celulares. Todas as moléculas lipídicas são anfipáticas, ou seja, possuem uma extremidade hidrofílica ou polar, voltada para o meio externo e uma extremidade hidrofóbica ou apolar, voltada para o meio interno (SQUIRES et al., 1999; ALBERTS et al., 2004).

Os lipídios de membrana mais abundantes são os fosfolipídios, predominantemente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomiéline, compostos de uma cabeça polar e duas caudas de hidrocarboneto de característica hidrofóbica, na qual água e moléculas dissolvidas na mesma passam a barreira com dificuldade.

As diferenças no comprimento e na saturação da cauda de ácidos graxos são importantes, pois influenciam na habilidade das moléculas de fosfolipídios em se agrupar, afetando, conseqüentemente, a fluidez da membrana (ALBERTS et al., 2004). Os glicolipídios estão localizados na superfície da membrana, enquanto o colesterol preenche os espaços entre as cadeias de ácidos graxos de fosfolipídios, estabilizando a membrana (PARKS E GRAHAM, 1992; SQUIRES et al., 1999). As proteínas estão entremeadas aos fosfolipídios (AMANN E PICKETT, 1987; HAFEZ, 1995), desempenhando a maioria das funções específicas da membrana (ALBERTS et al., 2004). Estas representam pouco mais de 50% do peso da maioria das membranas e são classificadas como integrais ou periféricas. As proteínas integrais servem como poros ou canais de membrana, receptores para íons e outras moléculas. Muitas proteínas integrais e periféricas contêm cadeias de carboidratos (AMANN E PICKETT, 1987; AMANN E GRAHAM, 1992; SQUIRES et al., 1999), que são denominadas de glicoproteínas.

A membrana não é estática. Geralmente todos os componentes estão dispostos aleatoriamente e são livres para movimentarem-se lateralmente. Isso porque a membrana é fluida à temperatura ambiente, denominado estado

líquidocristalino (PARKS E GRAHAM, 1992; SQUIRES et al., 1999). A proporção de colesterol : fosfolipídios, assim como a natureza dos fosfolipídios e a temperatura determinam a fluidez da membrana. Em geral, quanto mais colesterol presente, menos flexível ou menos fluida é a porção da membrana (AMANN E PICKETT, 1987; AMANN E GRAHAM, 1992).

Devido as diferenças na composição da membrana plasmática, cada compartimento exhibe propriedades físicas bastante diferentes (SQUIRES et al., 1999). A composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozóides de diferentes espécies de mamíferos é bastante variável. A membrana plasmática dos espermatozóides do garanhão é formada por fosfolipídios, divididos em fosfoglicerolipídios e esfingomielina (57%), colesterol (37%) e glicolipídios (6%) (GADELLA et.al., 2001). Fisiologicamente os fosfolipídios que compõem a membrana plasmática estão arranjados ao acaso e são livres para se movimentarem lateralmente. Esta mobilidade lateral dos fosfolipídios é conferida pela característica de fluidez da membrana na temperatura corpórea. Muitos fatores afetam a fluidez e a flexibilidade da membrana e dentre esses, o mais importante é a temperatura (AMANN E PICKETT, 1987; AMANN E GRAHAM, 1993). Outros fatores que alteram a fluidez da membrana são a localização, composição e distribuição dos fosfolipídios e a natureza das cadeias de ácidos graxos. Sabe-se que a proporção colesterol:fosfolipídios, bem como a natureza das cadeias de ácidos graxos saturados ou insaturados determina a fluidez da membrana. Em geral, quanto maior a quantidade de colesterol, menos flexível e fluida é a membrana. Normalmente quanto maior a proporção colesterol:fosfolipídios, mais resistente é a membrana plasmática às mudanças de temperatura (AMANN E PICKETT, 1987).

Os espermatozóides da espécie equina são mais sensíveis ao choque térmico durante a redução de temperatura porque possuem menos colesterol na sua membrana plasmática (KIRK et al., 2001). O colesterol atua estabilizando a membrana e diminuindo a temperatura na qual a membrana sofre a mudança da fase fluida-cristalina para gel e também tem a capacidade, quando em concentração elevada suficiente, de eliminar completamente a fase de transição (KIRK et al., 2001).

2.2 Princípios da Criopreservação:

O desafio da célula espermática durante o processo de congelamento não é sua habilidade em resistir à temperatura de armazenamento de -196°C , mas a sua capacidade de suportar mudanças que ocorrem durante as zonas intermediárias de temperatura (19°C a 8°C e -15°C a -60°C), pela qual elas devem passar duas vezes, durante o congelamento e o descongelamento (MAZUR, 1984).

No processo de criopreservação, o sêmen deve ser primeiramente resfriado da temperatura corpórea (37°C) à temperatura ambiente (20°C). 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). Estas alterações são parcialmente irreversíveis, sendo denominadas em conjunto, de “choque térmico”. O estado de choque térmico dos espermatozóides é caracterizado pelo aparecimento de movimento circular fechado ou anormal, perda prematura de motilidade, diminuição na produção de energia, aumento na permeabilidade da membrana e perda de moléculas e íons intracelulares, e danos acrossômicos (AMANN E PICKETT, 1987; PICKETT E AMANN, 1992), como edemaciamento e irregularidades do acrossoma (WATSON, 1995). A extensão dos danos provocados pelo choque térmico está associada à taxa de resfriamento e temperatura final a qual os espermatozóides estão sendo submetidos. Os danos causados aos espermatozóides durante o choque térmico são exacerbados na criopreservação (AMANN E PICKETT, 1987; PARKS E GRAHAM, 1992).

Modificações na organização em mosaico fluído da membrana, como assimetrias na bicamada lipídica e sua interação com as proteínas, podem provocar alterações nos receptores de membrana, alterando suas funções. A membrana plasmática afetada pelo frio pode sofrer mudanças na sua permeabilidade, resultando em alterações funcionais e metabólicas, o que prejudica a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozóides (AMANN E GRAHAM, 1993).

Durante a criopreservação os espermatozóides sofrem severos danos, pois o congelamento leva a formação de cristais de gelo intracelular e

extracelular, desidratação intracelular, que como consequência causa alterações na membrana celular e trânsito de moléculas através da célula durante o descongelamento (AMANN E PICKETT, 1987). Quando o sêmen é resfriado abaixo da temperatura de 5° C, os espermatozóides e o diluente ficam super-resfriados, porque os crioprotetores diminuem o ponto de congelamento da suspensão. Entre as temperaturas de -5°C e -15°C, dependendo da curva de congelamento, formam-se os cristais de gelo no meio iniciando o congelamento. À medida que a água do diluente congela, os solutos (sais, proteínas, açúcares e outros) se acumulam nos canais remanescentes, entre os cristais de gelo, no meio extracelular, junto aos espermatozóides que também ficam sequestrados nessas regiões. O aumento da concentração de solutos ao redor do espermatozóide altera o gradiente osmótico, favorecendo a saída de água de dentro da célula para o meio extracelular. Esse processo culmina na desidrataação dos espermatozóides (AMANN E PICKETT, 1987). No resfriamento lento (-25 a -40°C / min), o espermatozóide se desidrata devido à alta concentração de solutos no meio extracelular. Conseqüentemente, não se formam grandes cristais de gelo intracelulares (AMANN E PICKETT, 1987). Esta desidrataação 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°C / min), a água não tem tempo para sair da célula e, em algum ponto abaixo de -10°C, a célula sofrerá o congelamento interno. A curva de congelamento ideal deve ser suficientemente lenta para permitir que os espermatozóides se desidratem de forma rápida o bastante para evitar que os espermatozóides fiquem expostos por muito tempo as altas concentrações de soluto. As altas concentrações de soluto que promovem a desidrataação celular levam à deformação celular, causam danos estruturais na membrana, desalojam proteínas de membrana, desnaturam proteínas e separam as estruturas do citoesqueleto, sendo que todas estas alterações podem ser deletérias aos espermatozóides (SQUIRES et al, 1999). A extensão dos danos causados pelo gelo intracelular depende 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). Uma vez que as células alcancem a temperatura crítica (-60°C) (PARKS E GRAHAM, 1992; HAFEZ, 1995; GRAHAM, 1996), o espermatozóide é relativamente inerte e o sêmen pode ser imerso em nitrogênio líquido, para seu armazenamento por tempo indeterminado (GRAHAM, 1996).

A temperatura para o descongelamento a ser utilizada depende diretamente da curva de congelamento. Espermatozóides congelados numa curva lenta requerem uma curva de descongelamento lenta, para permitir o descongelamento dos cristais de gelo extracelulares (AMANN E PICKETT, 1987). O descongelamento desses cristais provoca a diluição dos solutos e lentamente ocorre a reidratação das células. Se o sêmen for descongelado muito rapidamente, os cristais extracelulares descongelam-se muito rapidamente e a água do meio invade bruscamente as células, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática (AMANN E PICKETT, 1987; HOLT, 2000). As células congeladas com uma 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 E PICKETT, 1987; PICKETT E AMANN, 1992; GRAHAM, 1996). A recristalização acontece preferencialmente quando o sêmen é congelado rapidamente e descongelado lentamente (AMANN E PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996). Dentre os fatores que afetam o descongelamento estão o tipo de envase, espessura da parede da palheta, condutividade de calor e a temperatura (AMANN E PICKETT, 1987). A utilização de temperatura alta, como 75°C por 7 segundos (COCHRAN et al., 1984; ARRUDA et al., 1986), seguida de imersão imediata em banho-maria a 37°C por, no mínimo, mais 5 segundos promovem maior viabilidade e motilidade espermáticas pós-descongelamento, comparada à temperatura e tempo (37°C, 30 segundos) utilizados rotineiramente (HOLT, 2000).

Para fecundar um oócito, o espermatozóide precisa apresentar pelo menos quatro atributos pós-descongelamento: (I) metabolismo para a produção de energia; (II) motilidade progressiva; (III) enzimas acrossomais intactas, necessárias para a penetração do espermatozóide através das estruturas que circundam o oócito; (IV) e proteínas de membrana plasmática, importantes para

a sobrevivência da célula espermática dentro do trato reprodutivo feminino e para a junção da mesma ao oócito no momento da fecundação (AMANN E PICKETT, 1987; PICKETT E AMANN, 1992).

Vários fatores afetam a fertilidade do sêmen congelado, dentre eles podemos citar: características do indivíduo, o crioprotetor, variação entre ejaculados, protocolo adequado e o procedimento de inseminação artificial (AMANN E PICKETT, 1987; GRAHAM, 1996). Pickett e Amann (1992) estimaram que 25 a 30% dos garanhões possuem sêmen de boa congelabilidade; 30 a 50% apresentam moderada congelabilidade; e 25 a 40%, reduzida congelabilidade. Portanto, recomenda-se que na primeira coleta e congelamento de sêmen de um garanhão, divida-se o ejaculado em alíquotas objetivando testar diferentes protocolos e crioprotetores. Um diluente excelente para determinado garanhão, não necessariamente será bom para outro. Nesta situação, o diluente e o protocolo que ofereça maior porcentagem de espermatozóides móveis após o descongelamento deve ser o eleito (GRAHAM, 1996).

2.3 Procedimentos utilizados na criopreservação do sêmen eqüino

O sêmen eqüino é coletado com auxílio de vagina artificial (AMANN E PICKETT, 1987; HAFEZ, 1995) e mantido aquecido para proteger os espermatozóides do choque térmico. Utiliza-se como manequim uma égua em cio natural ou de estro induzido pela administração intramuscular de estrógeno ou prostaglandina, assim como a utilização de um manequim construído com base de ferro e madeira acolchoada como forma segura para coletas de sêmen (SILVA FILHO et al., 1999). Após a coleta, o sêmen é avaliado (HAFEZ, 1995) quanto as características físicas macro e microscópicas (motilidade total, motilidade progressiva, vigor, concentração espermática, cor, aspecto). Para a criopreservação, é necessário que as características seminais estejam dentro das características mínimas requeridas para a espécie eqüina, isto é, motilidade espermática progressiva maior que 50% e concentração maior que 60 milhões de espermatozóides/mL (JASKO, 1994). Na raça Crioula, os parâmetros de motilidade ficam na média de 55,6% \pm 8,8 e a concentração em $10,19 \times 10^9 \pm 6,38$ (SUÑÉ et.al., 2001). Após a adição de diluente ao sêmen,

geralmente na proporção de 1:1, preconiza-se a centrifugação para reduzir o percentual de plasma seminal e aumentar a concentração espermática/ml.

A centrifugação tem duas finalidades: a eliminação de quase todo o plasma seminal e a obtenção de uma fração altamente concentrada em espermatozoides (AMANN E PICKETT, 1987). A remoção do plasma seminal antes do congelamento auxilia a manter a motilidade dos espermatozoides pós-descongelamento (NISHIKAWA, 1975). O plasma seminal eqüino é formado por secreções provenientes do epidídimo, ampola do ducto deferente, próstata, vesículas seminais e glândulas bulbo-uretrais. Estas secreções podem ser divididas em diferentes frações que apresentam funções diversificadas na cópula, na preservação do sêmen, no metabolismo e transporte espermático para o trato genital feminino, além de proteções imunológicas (TISCHNER et al., 1974; RODGER, 1975; MANN, 1975; VARNER et al., 1987). Nestas diferentes frações, a pré-secreção assume a função de limpeza da uretra, apresentando alta concentração de cloreto de sódio secretados pelas glândulas bulbo-uretrais (MANN, 1975; AURICH et al., 1997). A fração rica do sêmen que possui grande concentração de espermatozoides contém ergotionina e glicerilfosforilcolina (GPC), além de traços de ácido cítrico. Estes componentes do sêmen protegem os espermatozoides contra agentes peroxidantes, e desempenham um papel importante no metabolismo (MARDEN E WERTHESTEN, 1956). A última fração, oriunda da vesícula, contém alta concentração de ácido cítrico e pequena concentração de espermatozoides (MANN, 1975). O plasma seminal protege os espermatozoides através de processos oxidativos e fagocitários, diminuindo o crescimento de microorganismos patogênicos (KATILA, 1997).

Neste contexto imunológico foi sugerido que a remoção do plasma seminal possibilitaria a ação de reações inflamatórias, uma vez que suprime a quimiotaxia dos neutrófilos *in vitro* (TROEDSSON, 1995). Entretanto, Kotilainen et al. (1994) afirmaram que não há redução do número de neutrófilos com a remoção do plasma seminal em relação à sua presença no sêmen eqüino. O processo de centrifugação não é inócua aos espermatozoides, podendo reduzir sua motilidade. No entanto, os efeitos deletérios desse procedimento podem ser minimizados com a utilização de uma força centrífuga reduzida (PICKETT et al., 1975; GUAY et al., 1981, AMANN E PICKETT, 1987). A centrifugação

com uma força gravitacional de 370g a 829g não teve efeito prejudicial sobre a motilidade espermática antes do congelamento ou pós-descongelamento, quando a concentração de plasma foi mantida em torno de 10% (PICKETT et al.,1975). A centrifugação do sêmen em uma intensidade de 600 x g por 10 minutos, induziu menores alterações morfológicas nos espermatozóides e permitiu recuperação espermática de aproximadamente 87% de células após a ressuspensão (DELL'AQUA JÚNIOR E PAPA, 2001). A centrifugação do ejaculado com uma força centrífuga de 100 x g por 5 minutos não apresentou efeitos negativos sobre a motilidade (MARTIN ET AL., 1979).

A porcentagem de espermatozóides móveis antes da centrifugação deve ser similar à porcentagem pós, sendo aceitável uma perda de motilidade em torno de 10%. Havendo uma queda de motilidade superior a 10% durante a centrifugação, a força gravitacional, a duração da centrifugação e o diluente devem ser alterados (AMANN E PICKETT, 1987)

Para o sêmen ser armazenado a baixas temperaturas é necessário que os espermatozóides sejam diluídos em diluentes especiais e apropriados (AMANN E PICKETT, 1987; HOLT, 2000). Os diluentes de sêmen possuem uma série de componentes básicos. Dentre esses, a água atua como solvente de outros componentes do meio; tampões e substâncias não iônicas atuam na manutenção da osmolaridade e pH do meio; macromoléculas da gema do ovo e/ou leite atuam na prevenção do choque térmico; carboidratos servem como fonte de energia e outras substâncias como antibióticos, que controlam o crescimento microbiano; detergentes que emulsificam os lipídios presentes na gema de ovo, permitindo melhor interação entre esses componentes e a membrana plasmática; quelantes que se ligam ao cálcio e ao magnésio, limitando o movimento de íons bivalentes por meio da membrana, impedindo que os íons penetrem nas células espermáticas e as danifiquem durante o choque térmico e crioprotetores penetrantes ou intracelulares (AMANN E PICKETT, 1987).

A composição dos diluentes de congelamento de sêmen pode afetar os resultados do processo de criopreservação. A proteção das células durante a fase de desidratação que ocorre durante o congelamento e a estabilização da bicamada lipídica, como o impedimento da fusão de partículas intramembranas, depende das substâncias que compõem o diluente (CROWE

et.al. 1987 por SNOECK 2005). A característica mais importante de um crioprotetor é sua afinidade pela água. Dalimata e Graham (1997) afirmaram que os crioprotetores intracelulares possuem estruturas que promovem a ligação do hidrogênio com moléculas de água (propriedade coligativa) nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células. A sua capacidade de reduzir o ponto de congelamento (ponto em que ocorre a formação dos primeiros cristais de gelo) das soluções é uma de suas propriedades coligativas, (DALIMATA E GRAHAM, 1997).

Os crioprotetores são classificados como permeáveis e não permeáveis à membrana plasmática (NASH, 1966). Crioprotetores não permeáveis são representados por moléculas de alto peso molecular, como os açúcares, lipoproteínas da gema de ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos, são responsáveis pelo mecanismo de proteção no meio extra-celular (AMANN E PICKET, 1987). Já os permeáveis exercem ação tanto no meio extra quanto no intracelular, possuem mecanismos de ação específicos por suas propriedades coligativas ou de ligação com a molécula de água que tem suas características modificadas. No processo de congelamento o crioprotetor permeável limita a formação e retarda a expansão dos cristais de gelo e diminui as concentrações de soluto no meio extra e intracelular (NASH, 1966).

Na fase de descongelamento o crioprotetor permite que a célula se reidrate adequadamente. As características físico-químicas ideais do agente crioprotetor são: baixo peso molecular; alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (NASH, 1966).

Os agentes crioprotetores extracelulares são grandes moléculas que não atravessam a membrana plasmática e podem ser proteínas como as presentes no leite e na gema do ovo, açúcares como a lactose, frutose, manose, rafinose e trealose, polímeros sintéticos como o polivinilpirrolidone e a metilcelulose (JASKO, 1994).

Além dessas substâncias, a glicina, betaína, glutamina e prolina atuam como potentes crioprotetores não penetrantes (HOLT,2000). A utilização dessas substâncias antioxidantes nos diluidores pode atuar na preservação da motilidade espermática durante o período de estocagem e minimizar os efeitos da peroxidação lipídica (BALL et al., 2002). Os agentes crioprotetores não penetrantes atuam por meio de efeito osmótico, facilitando a desidratação

celular, pois tornam o meio do diluente seminal hipertônico. Com isso, a probabilidade de formação de cristais de gelo no interior das células, com conseqüente dano físico à membrana espermática, é reduzida (AMANN E PICKETT, 1987).

Diferentes componentes como alcoois, etilenoglicol, glicerol, polietilenoglicol, dimetilsulfóxido e também as amidas, dentre elas dimetilformamida podem ser utilizados como agentes crioprotetores para congelamento de sêmen (ASHWOOD-SMITH, 1987). O glicerol é o crioprotetor penetrante mais utilizado nos protocolos de congelamento (HOLT, 2000), embora não apresente um efeito crioprotetor igualmente eficiente na criopreservação do sêmen de todas as espécies. Smith e Polge (1950) foram os primeiros pesquisadores a relatar o efeito crioprotetor do glicerol. A adição de glicerol ao meio de congelamento de sêmen induz ao aumento do volume de canais de solvente não congelados e uma menor concentração de sais nestes canais (MAZUR, 1984). O efeito do glicerol na membrana plasmática pode ocorrer por meio de uma ligação direta aos fosfolipídios da membrana, reduzindo sua fluidez e interferindo na permeabilidade celular (PARKS E GRAHAM, 1992). Por outro lado, os efeitos deletérios do glicerol incluem estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez e permeabilidade da membrana, e na sua composição lipídica (WATSON, 1995).

O glicerol foi inicialmente utilizado na concentração de 7 a 10% (SMITH E POLGE, 1950). Nos eqüinos, a concentração ideal do glicerol varia de 3 a 4% (AMANN E PICKETT, 1987). Essas concentrações foram eficientes para preservar a motilidade do sêmen eqüino pós-descongelamento. No entanto, para minimizar os danos ao acrossoma foram necessárias concentrações menores que 2% (WATSON, 1995). Embora taxa de fertilidade similar com sêmen eqüino congelado utilizando-se concentrações de glicerol de 2 a 7% tenha sido reportada (GRAHAM et al., 1978) foi demonstrada uma superioridade nas características de motilidade espermática, motilidade progressiva, vigor e integridade da membrana plasmática após o descongelamento com o uso do glicerol na concentração de 2,5% (VIDAMENT et al., 2002; VIDAMENT et al., 2005).

Crioprotetores permeáveis como o etilenoglicol (3,5%) e a acetamida (5%) associados à metilcelulose e trealose podem ser utilizados como

crioprotetores alternativos para o congelamento de sêmen de garanhões (HENRY et al., 2002; SNOECK, 2003). Gomes et al. (2002) constataram que a associação de dimetilformamida com o glicerol apresentou melhores resultados quando comparada com o glicerol apenas. Os autores também afirmaram que a dimetilformamida é capaz de preservar a motilidade espermática semelhante a metilformamida e dimetilacetamida, a 3%; e que ambos tiveram atividade crioprotetora superior ao glicerol.

2.4 Criocapacitação

As organelas do espermatozóide são as estruturas que apresentam maior sensibilidade à redução brusca de temperatura. As membranas espermáticas afetadas pela criopreservação incluem as membranas plasmática, acrossômica externa e mitocondrial (WATSON, 1995). A causa primária dos danos celulares causados pelo congelamento é a desestabilização da membrana plasmática devido ao estresse térmico, mecânico, químico e osmótico (PARKS E GRAHAM, 1992). As membranas respondem a alterações de temperatura através de transição da fase lipídica (WATSON, 1995; WATSON, 2000; MEYERS et al., 2003).

Com a redução de temperatura, os movimentos laterais dos fosfolipídios se tornam mais restritos, devido à mudança da fase fluida para gel, resultando em agrupamento de proteínas para as áreas fluidas remanescentes. Dessa forma, há uma tendência de certos fosfolipídios formarem a micela hexagonal II, que pode ser ou não reversível (AMANN E PICKETT, 1987; PARKS E GRAHAM, 1992; WATSON, 1995). Modificações semelhantes na composição lipídica da membrana plasmática do espermatozóide são induzidas pelo bicarbonato presente no trato genital feminino, as quais foram observadas durante o processo de resfriamento (ASHWORTH et al., 1994). O resfriamento do sêmen abaixo da temperatura de transição da fase lipídica pode desequilibrar sistemas enzimáticos, tais como ATPases, da membrana espermática de eqüinos (WATSON, 1996; MEYERS et al., 2003), touros e carneiros (NAUC, 1992).

Além do desequilíbrio físico da membrana, a taxa de regulação do volume osmótico e as respostas a fatores de estresse da célula espermática são altamente dependentes da permeabilidade celular à água. Esta varia de

acordo com a espécie, temperatura ambiente, tipos de crioprotetores e formação de cristais de gelo (POMMER et al., 2002; MEYERS et al., 2003). Além disso, há evidências de que a permeabilidade da membrana plasmática seja diferente entre as regiões do espermatozóide (WATSON, 2000; MEYERS et al., 2003). Lesões sub-letais no sêmen eqüino foram identificadas, decorrentes de meio anisomótico (POMMER et al. 2002 ; MEYERS et al.2003). Embora a aparência das células estivesse normal à microscopia óptica, e o volume celular tenha retornado ao normal, houve redução significativa da motilidade espermática. Portanto, mudanças na pressão osmótica da fração descongelada, induzidas pela formação de cristais de gelo, podem aumentar a permeabilidade celular (WATSON, 2000). Da mesma forma, a permeabilidade celular pode ser modificada durante o resfriamento decorrente de alteração do envoltório lipídico, causada por crioprotetores intracelulares (WATSON, 2000; MEYERS et al., 2003).

Após o descongelamento do sêmen eqüino, os espermatozoides apresentam aumento na concentração de cálcio intracelular, indicando uma deficiência no controle desse íon (WATSON, 2000; MEYERS et al., 2003). A desorganização da membrana decorrente do congelamento/descongelamento provoca aumento da permeabilidade, e os íons cálcio presentes no meio extracelular penetrarão na célula, podendo estimular os eventos dependentes de cálcio, como a capacitação espermática (YANAGIMACHI,1994; WATSON,2000). O espermatozóide criopreservado pode ser considerado parcialmente capacitado, pois apresenta mudanças na fluidez da membrana. Sua sobrevivência é, portanto, limitada, pois o espermatozóide capacitado possui longevidade mais curta, e caso seu encontro com o oócito não ocorra, ele morrerá (WATSON ,1995).

2.5 O Colesterol

A distribuição do colesterol entre as membranas da célula espermática não é uniforme. A razão colesterol:fosfolipídios na membrana plasmática de espermatozoides eqüinos é cerca de 0,36 (DARIN-BENNETT E WHITE, 1977; PARKS E LYNCH, 1992 E CROSS, 1998). O colesterol também não está distribuído uniformemente nas faces interna e externa da membrana plasmática (YEAGLE, 1985).

O colesterol é capaz de intercambiar entre as membranas e dois mecanismos poderiam explicar a manutenção da sua distribuição. O primeiro seria devido a um equilíbrio termodinâmico (LANGE et al., 2004), no qual a composição da membrana, como o conteúdo lipídico e a natureza das proteínas, determinaria a quantidade relativa de colesterol. O outro mecanismo seria o fluxo de colesterol entre o local de síntese (fígado, intestino, córtex da adrenal e gônadas) e a membrana plasmática (YEAGLE, 1985).

O colesterol apresenta uma importante função na estabilização das membranas. A remoção do colesterol da membrana plasmática promove a sua desestabilização e, conseqüentemente a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (AMANN E GRAHAM, 1992; GADELLA et al., 2001; GADELLA E COLENBRANDER, 2003), aumentando sua capacidade de fusão (CROSS, 1998). A concentração de colesterol na membrana plasmática varia consideravelmente entre as espécies.

Acredita-se que a maior parte do colesterol do espermatozóide seja proveniente do ambiente, entretanto pouco se conhece sobre a dinâmica dos esteróides nas membranas espermáticas. Em algumas espécies a concentração de colesterol na membrana plasmática do espermatozóide muda através do trânsito epididimário. O espermatozóide eqüino tem seu conteúdo de colesterol reduzido durante a passagem pelo epidídimo (LOPEZ E SOUZA, 1991; CROSS, 1998). Visto que a maior proporção de colesterol : fosfolipídio na membrana plasmática promove maior estabilidade da mesma, foi sugerido que a inclusão de colesterol ou de lipossomas contendo colesterol no meio diluidor do sêmen poderia aumentar a viabilidade e a longevidade dos espermatozóides (WHITE, 1993; CROSS, 1998). Embora o colesterol promova menor fluidez da bicamada lipídica, em altas concentrações impede a aproximação das cadeias de hidrocarbonetos e sua cristalização. Dessa forma, o colesterol inibe possíveis transições de fase (ALBERTS et al., 2004), as quais estão associadas a mudanças na permeabilidade e na capacidade de fusão da membrana (HOLTH E NORTH, 1986).

Porém, estudos demonstraram que o conteúdo elevado de colesterol pode ser prejudicial ao espermatozóide (PARKS et al., 1981) e contribuir para a infertilidade do sêmen de humanos e garanhões (SUGKRAROEK et al., 1991; BRINSKO et al., 2005), por induzir um estado de decapacitação, inibindo a

reação acrossômica (DAVIS, 1978). Há evidências anteriores de que a capacidade fecundante do espermatozóide é influenciada pelos níveis de colesterol na membrana plasmática da célula espermática e que a fusão da membrana é inibida pelo colesterol (DAVIS E HUNGRUND,1976; DAVIS, 1980).

2.6 A utilização da gema de ovo na criopreservação de sêmen

A gema de ovo é um componente comum em diluentes de congelamento de sêmen de diversas espécies, pois confere proteção aos espermatozóides contra o choque térmico (PARKS E GRAHAM, 1992). Esta ação protetora se deve às lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e alto peso molecular, que foram identificadas como o fator protetor ativo na gema de ovo (MAYER E LASLEY, 1945; PARKS E GRAHAM, 1992; WEITZE E PETZOLDT, 1992; AMANN E GRAHAM, 1993;WATSON, 1995).

Esta fração lipoprotéica de baixa densidade é constituída de fosfolipídios e agiria somente na superfície celular, como um filme protetor. Além disso, a gema de ovo estabiliza a membrana espermática pela neutralização dos componentes deletérios existentes no plasma seminal (AURICH, 2005). Todavia, salienta-se que a gema de ovo contém progesterona, o que poderia induzir uma capacitação espermática precoce, ocasionando redução da fertilidade (LIPAR et al., 1999), pois, conforme demonstrado por CHENG et al. (1998), a ligação da progesterona exógena marcada ao receptor localizado na membrana plasmática do espermatozóide eqüino parece ser um importante passo na indução da reação do acrossomo. Quando presente em meios diluidores, a gema de ovo permite a redução da concentração de glicerol (WATSON, 1995).

Uma série de pesquisas têm sido realizadas sobre a função da gema de ovo nos diluentes de sêmen. O espermatozóide eqüino possui pouca ou nenhuma habilidade de adquirir resistência a fatores adversos quando comparado a espermatozóides de outros mamíferos domésticos (BOGART & MAYER, 1956). Entretanto, são capazes de adquirir resistência a essas condições, na presença do fator ou fatores de resistência espermática da gema de ovo. Estes pesquisadores concluíram que a gema de ovo foi o componente

do diluente capaz de proteger os espermatozóides dos efeitos danosos de certos ânions e cátions, dos efeitos deletérios de certos diluentes não isotônicos e dos efeitos de algumas substâncias tóxicas. A adição de um detergente ao meio diluidor aumentou a proteção exercida pela gema de ovo aos espermatozóides (PURSEL et al. 1978). Foi sugerido, portanto, que a associação entre os componentes lipídicos da gema de ovo e a membrana celular resultava em modificação dos eventos da fase de transição e que a emulsificação aumentava essa atividade protetora (WATSON, 1995). A gema é constituída de aproximadamente 65,5% de triglicerídeos, 28,3% de fosfolipídios e 5,2% de colesterol, o que corresponde a aproximadamente 4,8mg/g (SOUZA-SOARES E SIEWERDT, 2005).

Atualmente, busca-se componentes alternativos para substituir a gema de ovo de galinha em diluentes de congelamento de sêmen equino. A adição de colesterol ao diluente com subsequente retirada do colesterol pós descongelamento não apresentou diferença em relação à motilidade pós descongelamento, porém houve um incremento na porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra utilizando os testes hiposmótico e de fluorescência (OLIVEIRA, 2010). O uso do plasma da gema de ovo de galinha esterilizado, se mostrou eficaz ao substituir a gema de ovo para congelar sêmen equino (PILLET, et al., 2011)

A utilização de lipossomas a base de lecitina de soja em diversas concentrações também foi comparada com a gema de ovo de galinha, sendo que a motilidade pós-descongelamento com uso de gema de ovo de galinha foi superior à com lipossomas, porém não houve diferença no índice de fertilidade (PILLET, 2012). A lecitina de soja não encapsulada, foi outra alternativa para substituir a gema de ovo preservando a motilidade espermática, porém os índices de fertilidade foram inferiores ao uso de diluente com gema de ovo (PAPA et. al.,2011). Outra alternativa que foi estudada foi a utilização de gema de ovo de *Alectoris chukar*, uma espécie de Perdiz, que possui os níveis de lipídios similares à gema de galinha. Neste trabalho houve um incremento na motilidade total e progressiva com o uso de gema de *A. chukar* (HUMES E WEBB, 2006). A substituição da gema de ovo de galinha por gema de ovo de pata (*Anas platyrhynchos domesticus*) na criopreservação de sêmen de búfalos

resultou em um incremento da motilidade pós-descongelamento e na redução de defeitos espermáticos (ANDRABI et. al., 2008).

Até o momento, não se conhece estudos realizados avaliando a eficácia da gema de ema (*Rhea americana*) na criopreservação de sêmen. Esta gema possui distintas concentrações em seu perfil lipídico (tabela 1), e seu estudo no congelamento seminal pode abrir portas para conhecer melhor o papel de determinados lipídios na proteção espermática.

Tabela 1 – Perfil dos principais ácidos graxos contidos nas gemas de ovo de galinha e ema em mg/g.

LIPÍDIOS (mg/g)	GALINHA ¹	EMA ²
Proporção PUFA/SFA*	0,29±0,09	0,94±0,12
16:0	100,05±2,53	277,5±11,9
16:1	17,98±0,46	42,1±3,23
18:0	29,52±0,79	31,6±13,39
18:1	159,22±4,40	363,3±11,17
18:2	30,43±0,79	160,8±20,57
18:3	1,11±0,04	112,7±12
20:4	5,03±0,16	12±1,96
Colesterol	4,8±0,23	18,16±0,57

1-WANG (2000);2- NAVARRO (2001)

*PUFA: Ácidos Graxos Polinsaturados, SFA: Ácidos Graxos Saturados

2.7 Avaliação Espermática

A avaliação do sêmen é fundamental para a predição do desempenho reprodutivo do garanhão e possui dois principais objetivos: prever a fertilidade potencial de um determinado animal e avaliar com mais acurácia se o sêmen de um garanhão é capaz de ser submetido a procedimentos como o resfriamento e o congelamento (MAGISTRINI, 2000). Com o objetivo de correlacionar os resultados de avaliações laboratoriais com aqueles dos testes de fertilidade, muitos estudos têm investigado as diversas características seminais.

A avaliação da qualidade seminal tem tido como base a análise da motilidade espermática e das características morfológicas e a determinação do número de espermatozoides. A motilidade é a característica mais freqüentemente avaliada, embora sua correlação com a fertilidade seja

controversa (MAGISTRINI, 2000). O espermatozóide necessita da motilidade para a penetração na junção útero-tubárica, liberação dos sítios de armazenamento espermático na tuba uterina e penetração através de células que circundam o ovócito (AMANN, 1989; MAGISTRINI, 2000; NEILD, 2005). A motilidade espermática pode estar comprometida se as mitocôndrias estiverem afuncionais, se a membrana plasmática estiver lesada, se o espermatozóide tiver sofrido choque térmico ou se estiver morfológicamente anormal (KIRK, 2001; NEILD, 2005). Outras características seminais como porcentagem de espermatozóides viáveis, com membrana plasmática e acrossômica íntegra têm apresentado correlação positiva significativa com a fertilidade (JANUSKAUSKAS et al., 2000; GARCÍA-MACÍAS et al., 2006).

A avaliação da funcionalidade da membrana é realizada pelo teste hiposmótico (HOST). Quando os espermatozóides são submetidos às soluções hiposmóticas, aqueles com membrana funcional sofrem abaulamento na região da cauda, demonstrando que a membrana plasmática está mais frouxamente aderida. Enquanto o espermatozóide conseguir equilibrar a entrada e a saída de fluidos intracelulares é sinal de que a membrana plasmática está funcionalmente intacta. Quando o espermatozóide não mais suportar o estresse osmótico, a membrana plasmática se rompe e ocorre desespiralização da cauda (JEYENDRAN et al., 1984).

O teste hiposmótico pode ser realizado com a água destilada como solução hiposmótica (LOMEO E GIAMBERSIO, 1991). O teste hiposmótico é uma ferramenta de baixo custo e fácil execução, que proporciona mais subsídios na avaliação da viabilidade espermática, além de avaliar os espermatozóides individualmente, e não uma população de espermatozóides como ocorre na avaliação da motilidade progressiva (DELL'AQUA JR et al., 2002; NIELD et al., 1999).

Para avaliar a integridade estrutural da membrana foi desenvolvida a técnica de coloração de fluorescência, utilizando o diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (IP). Este método é baseado na hidrólise que o CFDA sofre ao penetrar os espermatozóides. O processo de hidrólise é desencadeado por esterases não específicas dentro da célula, produzindo carboxifluoresceína livre, que é retida dentro dos espermatozóides com membranas (plasmática e acrossomal) intactas, produzindo coloração

verde. Os espermatozoides com membranas lesadas não se coram de verde. Estas células coram-se de vermelho pelo IP, pois o IP tem afinidade pelo núcleo, e penetra apenas em células com membranas lesadas, ligando-se ao DNA (GARNER et. al.,1986; HARRISON E VICKERS, 1990)

3 ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Artigo a ser submetido a Acta Scientiae Veterinariae

CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO: COMPARAÇÃO DA GEMA DE OVO DE EMA (*Rhea americana*) COM A GEMA DE OVO DE GALINHA.

Cryopreservation of equine semen: comparison of rhea egg yolk (*Rhea americana*) with chicken egg yolk

Liana de Salles van der Linden¹, Santiago Duglio Schiavo², Márcio Maciel², Murilo Farias Rodrigues¹, Cintia Saydelles da Rosa¹, Ivan Cunha Bustamante-Filho³, Rodrigo Costa Mattos¹, Adriana Pires Neves¹⁻².

1-Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos (UFRGS) – Porto alegre, RS, Brazil

2- UNIPAMPA (Universidade Federal do Pampa) Dom Pedrito, RS, Brazil

3- Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, Brazil.

Artigo formatado conforme normas para publicação em revista*RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi comparar a utilização de diluentes comerciais à base de gema de ovo de galinha com os mesmos diluentes, nos quais se substituiu a gema de galinha pela de ovo de ema (*Rhea americana*). Foram utilizados Seis garanhões da raça Crioula, comprovadamente férteis e no período fora de temporada de monta e utilizados seis ejaculados de cada garanhão. O sêmen foi avaliado macroscopicamente quanto ao volume, aspecto e coloração. A seguir, avaliou-se a motilidade progressiva e total. O sêmen foi dividido em quatro alíquotas, e diluído na proporção 1:1 em diluente, Equimix (Nutricell Nutrientes Celulares) para centrifugação. Para adição do diluente de congelamento, foram utilizados, diluente A (FR-5, Nutricell Nutrientes Celulares), e B (Botu-crio. Biotech Botucatu S.A.) adicionados de 20 % de gema de ovo de ema, ou de 20% de gema de ovo de galinha. As amostras foram envasadas, identificadas e submetidas a congelamento conforme o protocolo. As palhetas foram descongeladas, em banho-maria a 37°C durante 30s, após um período mínimo de 7 dias e examinadas para os seguintes parâmetros: motilidade total e progressiva e integridade física e funcional da membrana plasmática do espermatozóide. Os diluentes comerciais com ou sem substituição de gema de ovo de ema não apresentaram diferenças estatísticas em relação à motilidade total e progressiva, porém observou-se diferença nos parâmetros quando comparados os diluentes comerciais. Houve diferença na funcionalidade da membrana apenas quando comparado diluente A e B com gema de ovo de ema. No parâmetro integridade de membrana não foi observado diferença estatística. Estes resultados demonstram que a gema de ovo de ema (*Rhea americana*) pode ser uma alternativa para produção de diluentes para congelamento de sêmen de equinos.

Palavras – chave: criopreservação, sêmen equino, gema de ovo.

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the use of two commercial extenders using chicken egg yolk with the same extenders, to which rhea (*Rhea americana*) egg yolk was added. Six Criolo breed stallions were used during the off-breeding season period. Six collections per stallion were used. The ejaculate aspect, total and progressive motility were evaluated with a microscope. After evaluation, semen samples were divided in four aliquots and diluted 1:1 in each of the centrifugation extender Equimix (Nutricell Nutrientes Celulares). For freeze that semen two commercial extenders were used: A (extender with glycerol) or B (extender with methylformamide) and was added 20% rhea egg yolk or 20% chicken egg yolk . Semen samples were thawed in a waterbath with a temperature of 37°C during 30s, and examined at least 1 week after freezing, for total and progressive motility, physical and functional membrane integrity (HOST test and CFDA-PI fluorescence). The extenders of a given brand with or without rhea egg yolk had no significant difference according to total and progressive motility, although there was difference ($p = 0,05$) between extenders when different brands were compared, no matter if they were added Rhea egg yolk or not. Membrane functionality showed difference only when compared Extender A and B with Rhea egg yolk. Membrane integrity had no significant difference between all the treatments. These results show that Rhea egg yolk might be an alternative to making an equine semen extender.

Keywords: cryopreservation, equine semen, egg yolk

Introdução

A indústria do cavalo no mundo exerce um importante papel como fonte de empregos e de renda. No Brasil, o rebanho de equinos no ano de 2004 estava constituído por 5.787.250 cabeças. Neste mesmo ano o faturamento de vendas em leilões foi em torno de 2.058.202.871; a indústria de medicamentos e suplementos movimentou cerca de R\$ 54.142.630,20 e o mercado de rações para equinos, R\$ 53.440.000,00 anualmente (SOUZA LIMA *et.al.*, 2006).

Neste contexto, as biotecnologias aplicadas na reprodução animal são uma importante ferramenta a serviço do crescimento do setor, como um instrumento direto de melhoramento genético. Pelas vantagens oferecidas, a inseminação artificial (IA) é, talvez, a biotecnologia com maior impacto sobre a reprodução equina, pois um garanhão pode deixar centenas de descendentes durante a vida se IA for usada de forma eficiente (Loomis, 2006). Na espécie equina, a IA é mundialmente utilizada, sendo a modalidade mais frequentemente utilizada o resfriamento do sêmen e transporte para o local onde a égua está alojada (Loomis, 2006).

A IA com sêmen congelado ainda tem questões técnicas a serem solucionadas, como a variação individual frente à criopreservação, o baixo rendimento de doses por ejaculado, o intenso manejo das éguas durante as inseminações, maior custo por prenhez, além da grande oscilação das taxas de prenhez em relação às obtidas com Monta Natural (MN) ou IA com sêmen a fresco ou refrigerado (Ball, 1998; Backman *et al.*, 2004). O desafio da célula espermática durante o processo de congelamento é suportar mudanças que ocorrem durante as zonas intermediárias de temperatura (19°C a 8°C e -15°C a -60°C), pela qual elas devem passar duas vezes, durante o congelamento e o descongelamento (MAZUR, 1984).

No processo de criopreservação, o sêmen deve ser primeiramente resfriado da temperatura corpórea (37°C) à temperatura ambiente (20°C). Este resfriamento aparentemente não causa danos aos espermatozóides, desde estes estejam diluídos em meio adequado, porém quando submetidos a refrigeração, passam por uma faixa crítica entre 19 e 8°C, em que os danos sofridos pelos espermatozóides podem ser severos (MORAN, 1992).

O colesterol apresenta importante função na criopreservação, atuando na estabilização das membranas, e caso removido da membrana plasmática

promove a sua desestabilização e, conseqüentemente a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (AMANN E GRAHAM, 1992; GADELLA et al., 2001; GADELLA E COLENBRANDER, 2003) ainda aumentando sua capacidade de fusão (CROSS, 1998). Considerando que a maior proporção de colesterol:fosfolípido na membrana plasmática promove maior estabilidade da mesma, teorias sugerem que a inclusão de colesterol ou de lipossomas contendo colesterol no diluente do sêmen poderia aumentar a viabilidade e a longevidade dos espermatozoides (WHITE, 1993; CROSS, 1998).

Um dos componentes dos diluentes de congelamento de sêmen de equinos é a gema de ovo em concentrações de 2,5 a 25% (SIEME, 2011). Este componente protege a membrana dos espermatozoides contra o choque térmico (PARKS E GRAHAM, 1992; SIEME 2011). Isto ocorre devido a presença das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e alto peso molecular, que foram identificadas como o fator protetor ativo na gema de ovo (MAYER E LASLEY, 1945; PARKS E GRAHAM, 1992; WEITZE E PETZOLDT, 1992; AMANN E GRAHAM, 1993; WATSON, 1995). A fração de LDL age como um filme protetor na superfície celular, além de estabilizar a membrana espermática neutralizando os componentes deletérios existentes no plasma seminal (AURICH, 2005).

Apesar do congelamento de sêmen equino apresentar resultados satisfatórios, busca-se um substituto para a gema de ovo com o intuito de se obter um meio diluente definido. Uma das formas de encontrar as corretas concentrações dos componentes necessários a criopreservação espermática é testar diferentes fontes de proteínas e lipídios. Diferentes gemas de ovo de aves vêm sendo testadas em função das suas diferentes composições lipídicas. O uso de gema de *A. Chukar* promoveu um incremento na motilidade total e progressiva, comparado ao uso da gema de ovo de galinha (HUMES E WEBB, 2006). O uso da gema de ovo de pata (*Anas platyrhynchos domesticus*) na criopreservação de sêmen de búfalos também resultou em incremento da motilidade pós-descongelamento e ainda na redução de defeitos espermáticos comparado ao uso gema de ovo de galinha (ANDRABI et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi comparar o uso de diluentes comerciais à base de gema de ovo de galinha com os mesmos diluentes, nos quais substituiu-se a gema de galinha pela de ovo de ema (*Rhea americana*).

Material e Métodos

Para selecionar os animais a ser utilizados no experimento, foi coletado sêmen de 16 garanhões da raça Crioula, pertencentes a criatórios dos municípios de Dom Pedrito, Lavras do sul e Santana do Livramento. Foram criopreservados dois ejaculados de cada animal com os dois diluentes comerciais a ser testados. Na Tabela 2 são apresentados os parâmetros seminais gerais dos animais.

Tabela 2: Características seminais pré e pós-descongelamento dos garanhões submetidos ao teste de congelamento.

Garanhão	MT (%)	MP(%)	MTPD(%)
A	80	60	55
B	80	60	45
C	15	10	1
D	80	70	1
E	50	40	15
F	60	30	40
G	55	35	25
H	90	80	60
I	80	60	60
J	80	70	65
K	85	65	60
L	70	65	50
M	70	50	15

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, MTPD: média de motilidade progressiva pós-descongelamento

A partir deste resultado, foram selecionados para o experimento final, seis garanhões da raça Crioula, comprovadamente férteis e no período fora de temporada de monta, pertencentes a criatórios dos municípios de Dom Pedrito e Lavras do Sul (RS). Os garanhões eram mantidos estabulados, com suplementação alimentar de concentrado e feno de alfafa. As coletas de sêmen foram realizadas nas propriedades de origem dos garanhões, sendo as

amostras processadas no Laboratório de Reprodução Animal (PROREP) na Faculdade de Zootecnia da Universidade Federal do Pampa, situada no município de Dom Pedrito – RS. Os exames das amostras pós-descongelamento foram efetuados no Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB), na Faculdade de Veterinária da UFRGS. As coletas de sêmen foram conduzidas com uma vagina artificial modelo Hannover (GÖTZE, 1949), revestida por um tubo interno de plástico descartável, lubrificado com vaselina sólida estéril e com copo coletor esterilizado (MATTOS, 1995). Como manequim, foi utilizada égua em cio, devidamente contida por peias. Foram utilizados seis ejaculados de cada garanhão.

O sêmen foi avaliado macroscopicamente quanto ao volume, aspecto e coloração. Após, efetuou-se a separação da fração gel e o sêmen filtrado através de gaze estéril. A motilidade progressiva e total foi avaliada. A concentração espermática foi avaliada através de contagem em câmara de Neubauer. Através da multiplicação da concentração obtida pelo volume espermático, obteve-se o número total de espermatozóides da amostra.

A seguir, o ejaculado foi dividido em quatro alíquotas, e diluído na proporção 1:1 em diluente, (Equimix[®], Nutricell Nutrientes Celulares) para centrifugação a 400g durante 10 minutos, com o objetivo de separar o plasma seminal (Martin et al., 1979). A concentração final foi ajustada para 200×10^6 espermatozóides/ml, quando da adição do diluente de congelamento. Para adição do diluente de congelamento foram utilizados Botu-Crio[®] (Biotech Botucatu S.A.), e FR-5[®] (Nutricell Nutrientes Celulares). O diluente FR-5[®] é composto por leite desnatado e gema de ovo e contém glicerol como crioprotetor. O diluente Botu-Crio[®] contém glicídios, aminoácidos, gema de ovo, glicerol e dimetilformamida. Ambos diluentes foram enviados também na forma sem adição de gema de ovo de galinha, possibilitando a adição da gema de ovo de ema, na mesma proporção indicada pelos fabricantes, ou seja, 20%. As amostras foram envasadas e identificadas em palhetas de 0,5mL (IMV, Minneapolis, MN, EUA). As palhetas foram lacradas e estabilizadas a 5°C por 30 minutos e distribuídas em uma plataforma a 3cm do vapor de nitrogênio por 30 minutos. Imediatamente após, as palhetas foram submersas e acondicionadas no botijão criogênico. Após no mínimo sete dias, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37° C durante 30 segundos e

examinadas para os seguintes parâmetros: motilidade total e progressiva, e integridade física e funcional da membrana plasmática do espermatozóide.

As amostras foram analisadas através do software Prism 5 (GraphPad, USA). Foi feita uma análise fatorial 2x2, usando teste de Bonferroni como post-test, com significância de 5%.

Resultados

As características do sêmen fresco dos seis garanhões utilizados no experimento estão apresentadas na tabela 1

A motilidade total variou de 65 a 85.5%, enquanto que a motilidade progressiva variou de 48,3 a 65% . A concentração espermática/ml variou de 72,8 a 274 x 10⁶ e o número total de espermatozoides no ejaculado apresentou uma variação de 5,65 a 17,13 x 10⁹. Na tabela 1, pode-se observar que os parâmetros seminais estão de acordo com os encontrados na literatura para cavalos crioulos (SUÑÉ, 2001).

Na avaliação da motilidade pós-descongelamento o sêmen congelado com o diluente Botu-crio apresentou melhores resultados ($p < 0,001$) independente do tipo de gema de ovo utilizado. O mesmo resultado foi observado na motilidade progressiva (figura 2).

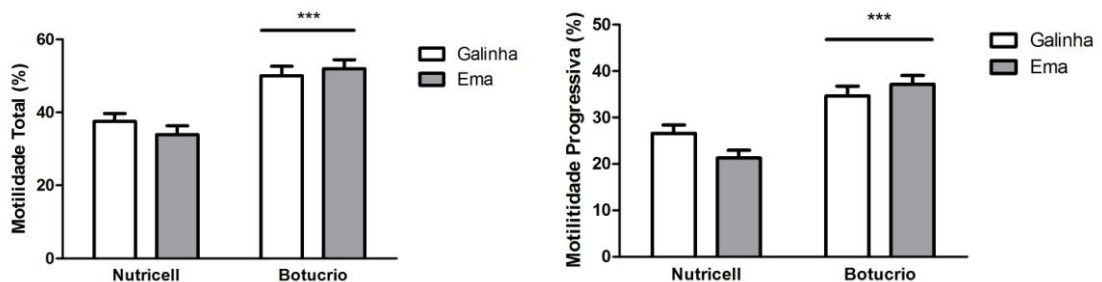


Figura 2 – Efeito do diluente e tipo de gema de ovo na motilidade total e progressiva de sêmen equino da raça Crioula criopreservado. *** significa $p < 0,001$.

Tabela 3- Características do sêmen fresco dos garanhões da raça crioula submetidos a criopreservação.

Garanhão	A	B	C	D	E	F
Numero de ejaculados	6	6	6	6	5	5
Volume	31,2±9,2	28,16±11,8	19,5±12,1	80,2±32,4	49,8±5,6	91,8±69,5
Concentração (x 10 ⁶ sptz/mL)	243±45,7	114,5±16,2	84,5±41,8	72,8±13,4	274±38,5	192,2±89
NTE (x 10 ⁹ sptz/mL)	7,88±3,43	3,22±1,38	2,89±2,1	5,65±1,79	13,67±2,57	17,13±11,91
MT Fresco (%)	78,4±15	80±17,7	73,4±17,3	65±12,7	82±8,4	85±5
MP Fresco (%)	61,7±9,8	65±12,2	56,7±12,1	48,3±7,5	62±8,4	65±5
NTE – numero total de espermatozoides; MT – motilidade total; MP - motilidade progressiva.						

Tabela 4- Características do sêmen pós descongelamento

Garanhão		A	B	C	D	E	F
FR-5	MT	35,8 \pm 9,17	43,37 \pm 12,24	23,34 \pm 8,68	42,5 \pm 9	45 \pm 7,07	45 \pm 7,07
	MP	25,8 \pm 9,17	31,67 \pm 8,16	14,17 \pm 4,92	30,83 \pm 4,93	35 \pm 7,07	30 \pm 0,7
	HOST	21,3 \pm 9,24	27,5 \pm 11,71	10,92 \pm 5,43	19,5 \pm 10,01	13,25 \pm 1,06	14,75 \pm 3,18
	CFDA/PI	19,7 \pm 11,79	35,67 \pm 13,65	41,17 \pm 13,93	33,83 \pm 11,62	33,5 \pm 14,85	31,5 \pm 2,12
FR-5 + ema	MT	42,5 \pm 8,65	32,5 \pm 16,51	27,5 \pm 9	42,5 \pm 7,34	30 \pm 3,01	10 \pm 7,07
	MP	25 \pm 4,47	20 \pm 10,49	15,83 \pm 4,92	30 \pm 3,16	20 \pm 2,21	5 \pm 2,31
	HOST	19,92 \pm 10,96	13,33 \pm 6,68	12,42 \pm 3,9	14,83 \pm 7,31	32,75 \pm 9,55	3,5 \pm 0,7
	CFDA/PI	20,17 \pm 11	26,83 \pm 11,5	29,5 \pm 8,6	23,83 \pm 11,97	25 \pm 12,73	29,5 \pm 10,6
Botu-crio	MT	56,67 \pm 10,01	46,66 \pm 20,86	34,17 \pm 11,01	60 \pm 15,39	60 \pm 10	47,5 \pm 10,63
	MP	39,17 \pm 7,36	35,83 \pm 15,94	21,67 \pm 6,83	40,83 \pm 13,35	40 \pm 10	32,5 \pm 3,53
	HOST	21,42 \pm 7,72	28,42 \pm 7,25	14,75 \pm 7,3	18,67 \pm 6,49	27,25 \pm 16,26	14,25 \pm 4,59
	CFDA/PI	30 \pm 8,34	24 \pm 8,27	31,33 \pm 8,04	39,5 \pm 10,19	35,5 \pm 16,26	21 \pm 7,07
Botu-crio + ema	MT	52,5 \pm 15,37	53,29 \pm 9,24	37,5 \pm 14,76	65,83 \pm 8,08	50 \pm 10	50 \pm 14,04
	MP	35,83 \pm 10,29	41,67 \pm 5,16	25,83 \pm 10,68	45,83 \pm 4,92	37,5 \pm 3,54	35 \pm 7,07
	HOST	28,42 \pm 8,73	31,92 \pm 4,58	12,17 \pm 9,33	19,08 \pm 4,8	32 \pm 14,14	18,25 \pm 3,15
	CFDA/PI	31,5 \pm 9,71	33,50 \pm 16,62	33 \pm 8,05	35,33 \pm 9,69	31 \pm 0,71	11,5 \pm 3,54

Com relação a qualidade da membrana plasmática pós-congelamento, o diluente Botu-crio apresentou melhor resultado na preservação da funcionalidade de membrana ($p < 0,01$). Novamente não foi evidenciada diferença entre diluentes utilizando gema de ovo de galinha e gema de ovo de ema.

Na avaliação da integridade de membrana, porém, o uso do diluente FR-5 Nutricell composto por gema de ovo de ema foi menos eficaz que FR-5 com gema de ovo de galinha ($p < 0,05$). Este efeito não foi observado no diluente Botu-crio (figura3).

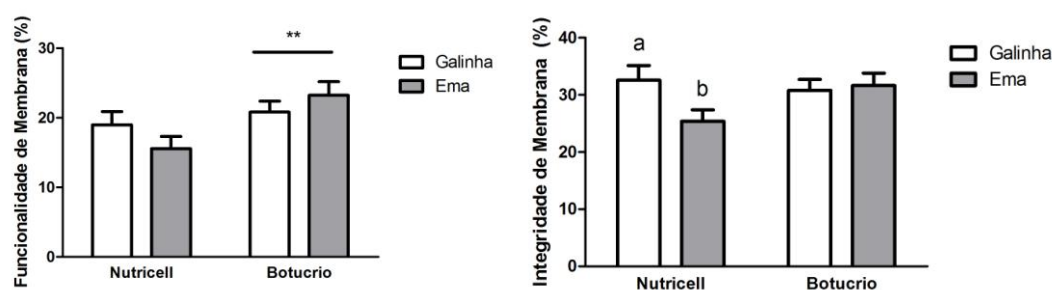


Figura 3 - Efeito do diluente e tipo de gema de ovo na funcionalidade e integridade de membrana de sêmen equino da raça Crioula criopreservado. ** significa $p < 0,01$; a, b significa $p < 0,05$.

Discussão

No presente experimento comparou-se o efeito da gema de ovo de ema com o da gema de ovo de galinha em diluentes comerciais para congelamento de sêmen de garanhões. Na avaliação de motilidade espermática, tanto total quanto progressiva, o diluente Botu-crio[®] apresentou melhores resultados que o diluente FR-5[®], não sendo encontrada interação do tipo de gema. Estes resultados sugerem que as diferenças de composição química, principalmente lipídica, não afetam este parâmetro. Resultados semelhantes já foram relatados em trabalhos que compararam diluentes a base de glicerol, com diluentes associando glicerol e amidas (GOMES, 2002; PAPA et.al., 2002, TERRACIANO, 2008). O tipo de crioprotetor utilizado pode ter papel mais

importante que a fonte de lipídios para a manutenção da motilidade.pós-congelamento.

A integridade de membrana foi o único parâmetro que apresentou correlação entre o tipo de diluente e tipo de gema de ovo. Talvez, algum componente, provavelmente o excesso de ácidos graxos polinsaturados (PUFA) tenha algum efeito deletério ao espermatozóide. A literatura cita a razão PUFA/SFA três vezes maior na gema de ovo de ema do que na gema de galinha (WANG,2000; NAVARRO, 2001). Tal fato sugere que o uso desta fonte lipídica pode predispor a ocorrência de estresse oxidativo, uma vez que uma maior quantidade de PUFA potencializa a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SANOKA, 2004). Dentre os ácidos graxos que estão em maior quantidade na gema de ovo de ema, destacam-se: ácido araquidônico (2,4x); ácido linoleico (5,28x); e ácido oleico (2,28x). O estudo de Awda (2009) com javalis, demonstrou que a membrana plasmática é sensível ao dano da peroxidação lipídica causada por ROS devido a (I) a alta concentração de PUFAs que servem como substratos preferidos para geração de ROS na membrana; (II) reduzida capacidade antioxidante do plasma seminal. A lipoperoxidação da membrana plasmática de espermatozoides diminui sua fluidez, alterando a forma com que a célula lida com alterações de osmolaridade (AWDA,2009). Outra pesquisa demonstrou ainda que os parâmetros seminais foram relacionados negativamente com a razão total de n-6, n-3 PUFAs no seu conteúdo (AM-IN, 2010).

A toxicidade do glicerol pode ser uma das razões da variação na congelabilidade do sêmen equino, o que fez aumentar as pesquisas em crioprotetores alternativos. As amidas então, por terem baixo peso molecular e baixa toxicidade foram o foco destas pesquisas (ALVARENGA et. al, 2005). O uso de dimetilformamida associada ao glicerol apresentou resultados laboratoriais e de fertilidade superiores ao relatado na literatura quando comparado ao uso apenas de glicerol (PAPA et. Al, 2002,GOMES et.al., 2002). Nesta pesquisa o sêmen diluído com metilformamida também revelou melhor resultado.

Salienta-se que, embora estatisticamente não significativos, os outros parâmetros avaliados (MT, MP e funcionalidade da membrana) apresentaram

média absoluta sempre menor quando associada o FR-5[®] e gema de ovo de ema.

Conclusão e perspectivas

Nas condições em que se realizou o presente experimento e com base nos resultados obtidos foi possível concluir que a gema de ovo de ema (*Rhea americana*) pode ser uma alternativa para produção de diluentes para congelamento de sêmen de equinos. Contudo, uma redução na integridade de membrana espermática foi observado com a gema de ovo de ema foi usada em diluente que usa apenas glicerol como crioprotetor. Destaca-se ainda que encontrou-se maior eficiência na criopreservação do sêmen equino com a utilização de diluente a base de amidas, independente do tipo de gema utilizado. Estudos futuros testando diferentes concentrações de gema de ovo de ema podem contribuir para determinar a concentração ideal de lipídios específicos para a criopreservação do espermatozóide equino.

Bibliografia

ABCCC - **ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAVALOS CRIoulos** Disponível em:<<http://www.abccc.com.br/noticias>>. Acesso em: 18 jun. 2011.

ALVARENGA, M.A. et al. Amides as cryoprotectant for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. Cap. 80, p. 717-718.

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

AM-IN, N. , KIRKWOOD, R.N., TECHAKUMPHU, M., TANTASUPARUK,W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility . **Theriogenology**, v.75, p 897–903, 2011.

ANDRABI, S.M.H., ANSARI, M.S., ULLAH, N., ANWAR, M., MEHMOOD, A., AKHTER, S. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 427-433, 2008.

AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H. et al. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48, n. 2, p. 185-192, 1997.

AWDA BJ, MACKENZIE-BELL M, BUHR MM. Reactive oxygen species and boar sperm function. **Biology of Reproduction**, 2009;81:553– 61.

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

BALL BA. An introduction to the use and application of cryopreserved equine semen. In: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, 1998, Davis. **Proceedings...**Davis: [s.n.], 1998a. p.25-41.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 7-11, p. 7-11, 1998. 2

GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: **PROCEEDINGS OF A WORK SHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS**, 12, Brewster – Massachusetts, p. 43-48, 2003.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M. et. al. Capacitation and acrossome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p. 249-265, 2001.

DAVIES MOREL MCG. **Equine Artificial Insemination**. Wallingford, Oxon: CABInternational; 1999.

GOMES, G.M., PAPA, F.O., JACOB, J.C.F.; MACEDO, L.P.;LEÃO,K.M.;MACHADO, M.S., ALVARENGA, M.A. Melhoria dos parâmetros espermáticos pós descongelação com o meio MP-50 para sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v26, n.3, p. 187-189, 2002.

GÖTZE, R. *Besamung und Unfruchtbarkeit des Haussäugetieres*. Hannover: Schaper Verlag, 1949.

LOOMIS PR. Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. In: **Carnevale E.M. Vet Clin North Am Equine Pract** 2006; 22:663-676.

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

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

MATTOS, R. *Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen eqüino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana*. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária (UFRGS), Porto Alegre, 1995, 98p.

MAYER, D. T.; LASLEY, J. F. The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities, and fertilizing ability of mammalian spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 4, n. 3, p. 261-269, 1945.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, n.16, p.125-142, 1984.

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

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JR, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP 50 para criopreservação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, v.26, n.3, p.184-187, 2002.

PICKETT BW, SHINER KA. Recent developments in artificial insemination in horses. **Liv Prod Sci**, v.40, p.31-36, 1994.

SANOCKA, D., KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 1-7, 2004.

SIEME, H. **Semen extenders for frozen semen**. Equine Reproduction 2nd edition, v.2, p. 2964-2971, 2011

SOUZA LIMA, R.A., SHIROTA, R., CAMARGO BARROS, G.S. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Centro de estudos de economia apicada. ESALQ, USP, p. 12-19, 2006

SUÑÉ, AICP. Características seminais de equinos da Raça Crioula e fertilidade. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Pelotas, 38p, 2001

TERRACIANO, P.B., BUSTAMANTE FILHO, I.C., MIQUELITO, L.V., ARLAS, T.R., CASTRO, F. MATTOS, R.C., PASSOS, E.Q., OBERST, E.R., CIRNE LIMA, E.O. Criopreservação de espermatozoides eqüinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. **Ciência Rural**, v.38, n.7, 2008.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Development**, v.7, n.4, p.871-891, 1995.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.209-222, 1992.

WANG, Y., SUNWOO, H., CHERIAN, G., DLIM, J.L. Fatty Acid determination in chicken egg yolk: A comparison of different methods. **Poultry Science**, v.79, p.1168-1171, 2000.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Development**, v.7, n.4, p.871-891, 1995.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A utilização de gema de ovo de ema em diluentes de congelamento de sêmen de garanhões pode ser uma alternativa, pois não foi melhor nem pior que o uso de gema de ovo de galinha.
- A concentração de gema de ovo de ema utilizada neste experimento pode ter sido elevada considerando o perfil lipídico desta gema, devendo então ser testada em outras concentrações.
- No presente experimento não foi feito teste de fertilidade, portanto não se pode inferir sobre a capacidade de fecundação usando esta fonte de lipídios.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABCCC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE CAVALOS
CRIoulos Disponível em:<<http://www.abccc.com.br/noticias>>. Acesso em: 18 jun. 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS et al. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. In: _____. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 10, p. 583-595.

ALVARENGA, M.A. et al. Amides as cryoprotectant for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.

AMANN, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v. 10, n. 2, p.89-98, 1989

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. Cap. 80, p. 717-718.

AMANN,R.P. Fertility of cryopreserved sperm. **Contraception Fertilité Sexualite**, v.19, p.946-954, 1991.

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

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. Cap. 80, p. 769-789

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.

AM-IN, N. , KIRKWOOD, R.N., TECHAKUMPHU, M., TANTASUPARUK,W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility . **Theriogenology**, v.75, p 897–903, 2011.

ANDRABI, S.M.H., ANSARI, M.S., ULLAH, N., ANWAR, M., MEHMOOD, A., AKHTER, S.. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 427-433, 2008.

ARRUDA RP, VIEIRA RC, MANZANO A.. Inseminação artificial de eqüídeos com sêmen congelado em palhetas de 0.5 mL. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**. Cuiabá, MT: Universidade Federal de Mato Grosso. p 181, 1986.

ASHWORTH, P. J. C.; HARRISON, R. A. P.; MILLER, N. G. A. et al. Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. **Reproduction Fertility Development**, v. 6, n. 2, p. 173-180, 1994.

AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H. et al. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48, n. 2, p. 185-192, 1997.

AURICH C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.

BALL BA. An introduction to the use and application of cryopreserved equine semen. In: Equine Assisted Reproductive Technology Workshop, 1998, Davis. **Proceedings...Davis: [s.n.]**, 1998 p.25-41.

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

BOGART, R.; MAYER, D. T. The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to spermatozoa viability. **Journal of Animal Science**, v.9, p.143-152, 1950.

BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BAUER, J. E. et al. Cholesterol and phospholipid analysis in sperm of stallions with unexplained subfertility. **AAEP Proceedings**, v. 51, 2005. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2005/brinsko/chapter.asp?LA=1>. Acessado em: 20/11/2011.

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. **Biology of Reproduction**, v.59, p.733-742, 1998.

CHRISTENSEN, P. Evaluation of equine spermatozoa: the use of transmission electron microscopy and in vitro acrossome reaction. 1995. 133p. **Tese** (Doutor em Medicina Veterinária)- Copenhagen: The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen.

COCHRAN, J.D., AMANN, R.P., FROMAN, D.P. 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.6, p.735-741, 1983.

CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 7-11, p. 7-11, 1998.

CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F. et. al. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. **Biochemical Journal**, v.242, n.3, 2001.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**, v. 48, n.5, p. 831-841, 1997.

DARIN-BENNETT, A.; WHITE, I. G. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. **Cryobiology**, v. 14, n.4, p. 466-470, 1977.

DAVIS, B. K. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. Symposium on the pharmacological effects of lipids. **AOCS Monograph** n. 5, p. 145-157, 1978.

DAVIS, B. K. Interaction of lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. **Archives of Andrology**, v. 5, n. 3, p. 249-254, 1980.

DAVIS, B. K.; HUNGRUND, B. J. Effect of modified membrane vesicles from seminal plasma on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 69, n.4, p. 1004-1010, 1976.

DELL'AQUA JÚNIOR, J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. et al. Effects of warming rate on sperm parameters and insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science** (Abstracts), v.68, p.344-345, 2001.

DELL'AQUA JÚNIOR, J. A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S. et. al. Novo teste osmótico da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.189-191, 2002.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. The **Physiology of Reproduction**. 2ed. New York: Raven Press, 1994. Cap. 2, p. 29-77.

GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B. Bicarbonate dependent capacitation of mammalian sperm cells: a comparative overview. In: **PROCEEDINGS OF A WORK SHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS**, 12, Brewster – Massachusetts, p. 43-48, 2003.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M. et. al. Capacitation and acrossome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p. 249-265, 2001.

GARCÍA-MACÍAS, V.; PAZ, P.; MARTINEZ-PASTOR, F. et al. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and sperm-bos-halomax (bright-

field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. **International Journal of Andrology**, v. 30, n.2, p. 1-11, 2006.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A. et. al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v.34, p.127-138, 1986.

GOMES, G.M.; PAPA, F.O.; JACOB, J.C.F. et Al. Melhoria dos parâmetros espermáticos pós-descongelamento com meio MP-50 para sêmen de garanhões da raça mangalarga marchador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.187-189, 2002.

GÖTZE, R. **Besamung und Unfruchtbarkeit des Haussäugetieres**. Hannover: Schaper Verlag, 1949.

GRAHAM, J. K.; CRABO, B. G.; PACE, M. M. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. **Journal of Animal Science**, v. 47, Suppl. 2, p. 80-119, 1978.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Reproduction and Technology**, v.12, n.1, p.131-145, 1996.

GUAY, P.; RONDEAU, M.; BOUCHER, S.. Effects of glycerol on motility, viability, extracellular aspartate aminotransferase release and fertility of stallion semen before and after freezing. **Equine Veterinary Journal**, v.13, n.3, p.177-182, 1981.

HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. Cap. 24, p. 513-535.

HARRISON, R.A.P. VIKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

HENRY, M. SNOECK, P.P.N. COTORELLO, A.C.P. Post-thaw spermatozoa plasma membrane integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v.58, p.245-248, 2002.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, n. 2, p. 447-457, 1986.

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

HUMES, R., WEBB, G., Use of chicken or chukar egg yolk with two cryoprotectants for preservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 62-63, 2006.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SÖDERQUIST, L. et al. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in swedish dairy bulls. **Theriogenology**, v. 53, n. 4, p. 859-875, 2000.

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

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

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

KATILA, T. Interactions of the uterus and semen. **Pferdeheilkunde**, v.5, p.508-511, 1997.

KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytes in the equine uterus. **Theriogenology**, v.41, n.3, p. 629-636, 1994.

LAGARES, M. A; PETZOLDT, R.; SIEME, H. et al. Preservação do sêmen fresco eqüino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 29-42, 1998.

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

LOMEO, A. M.; GIAMBERSO, A. M. "Water test": a simple method to assess sperm-membrane integrity. **International Journal of Andrology**, v. 14, n.4, p. 278-282, 1991.

LOPEZ, M. L.; SOUZA, W. Distribution of fillipin-sterol complexes in the plasma membrane of stallion spermatozoa during the epididymal maturation process. **Molecular Reproduction Development**, v. 28, n.2, p. 158-168, 1991.

LOOMIS PR. Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. In: **Carnevale E.M. Vet Clin North Am Equine Pract** 2006; 22:663-676.

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.

- MAGISTRINI, M. Semen evaluation. IN: SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. Cap.8.
- MAYER, D. T.; LASLEY, J. F. The factor in egg yolk affecting the resistance, storage potentialities, and fertilizing ability of mammalian spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v. 4, n. 3, p. 261-269, 1945.
- MANN, T. Biochemistry of stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, vol. 23, p.47-52, 1975.
- MARDEN, W.; WERTHESTEN, N. T. Influence of seminal fluid on sperm motility. **Fertility and Sterility**, v.7, p.508- 515, 1956.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volumes straws. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.27, p.47-51, 1979.
- MATTOS, R. Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen eqüino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária (UFRGS), Porto Alegre, 1995, 98p.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, n.16, p.125-142, 1984.
- MEYERS, S. A.; TABLIN, F.; COWE, J. H. Does cellular injury resulting from cryopreservation share traits with sperm capacitation? In: **PROCEEDINGS OF A WORK SHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS**, 12, 2003, Brewster – Massachusetts, p.70-73.
- MORAN, D. M. Effects of cooling rate and storage temperature on motion characteristics of stallion spermatozoa Fort Collins: Colorado State University, 1992.
- NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERYMAN HT, ed. **Cryobiology**. New York: Academic. 179-210p., 1966.
- NAUC, V. A. Plasma membrane of sperm: cryodamages and cryoprotection. In: **12th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION**, 1992, The Hague – Holanda.
- NEILD, D. M. Evaluation of equine sperm membrane function: effects of cryopreservation. 2005. 110f. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculty of Veterinary Sciences, Utrecht University, Utrecht.
- NEILD, D.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B. et. al. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727,1999.

NISHIKAWA, Y. Studies on the preservation of raw and frozen horse semen. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.23, p.99-104, 1975.

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 durin cryopreservation of stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.194-200, 2010

PAPA, F.O.; ZAHN,F.S.; DELL'AQUA JR, J.A.; ALVARENGA,M.A. Utilização do diluente MP 50 para criopreservação de sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.184-187, 2002.

PAPA, F.O., FELICIO, G.B., MELO-OÑA, C.M., ALVARENGA, M.A., DE VITA, B., TRINQUE, C., PUOLI-FILHO, J.N.P., DELL'AQUA JR, J.A. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.129 , p 73-77, 2011.

PARKS, J.E.; MEACHAM, T.N.; SAACKE, R.G. Cholesterol and phospholipid of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phsphotidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids, and viability at 4°C and 37°C. **Biology of Reproduction**, v.24, p.399-404, 1981.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, n.2, p.209-222, 1992.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, W.W. et al.. Effects of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.26, p.167-174, 1975.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. Cap. 83, p. 769-789.

PICKETT BW, SHINER KA. Recent developments in artificial insemination in horses. **Liv Prod Sci**, v.40, p.31-36, 1994.

PILLET, E. , DUCHAMP, G. ,BATELLIER, F. ,BEAUMAL, V., ANTON, M ., DESHERCES, S. , SCHIMITT, E., MAGISTRINI, M. Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. **Theriogenology**, v. 75, p. 105-114, 2011.

PILLET, E., LABBE, C., BATELIER, F., DUCHAMP, G. , BEAUMAL, V., ANTON, M ., DESHERCES, S., SCHIMITT, E., MAGISTRINI, M. Lipossomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. **Theriogenology**, v.77, p 268-279, 2012.

POMMER, A.C., RUTLLANT, J., MEYERS, S.A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. **Theriogenology**, v.58, p.1373–1384, 2002

PURSEL, V. G., SCHULMAN, L. L., JOHNSON, L. A. Effect of glycerol concentration on frozen boar sperm. **Theriogenology**, v. 9, p.305-312, 1978.

RODGER, J. C. Seminal plasma an unnecessary evil. **Theriogenology**, v.3, n. 6, p. 237-246, 1975.

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

SANOCKA, D., KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 1-7, 2004.

SIEME, H. Semen Extenders for Frozen Semen. In: Mc. Kinnon, A. et. al. **Equine Reproduction**. Second edition, Philadelphia: Lea&Febiger. v.2, p.2964-2971, 2011

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

SMITH, A. U., POLGE, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. **Nature**, v. 166 p. 668-669, 1950

SNOEK, P.F.N., Aspectos da criopreservação de sêmen equino: Composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. **Tese** (Doutorado), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 110p, 2003

SOUZA LIMA, R.A., SHIROTA, R., CAMARGO BARROS, G.S. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Centro de estudos de economia aplicada. ESALQ, USP, p. 12-19, 2006

SOUZA-SOARES, L.A.; SIEWERDT, F. **Aves e ovos**. Pelotas: Editora da Universidade. UFPEL, 2005. 137 p

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K. et al. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, Bulletin n. 9. Fort Collins: Colorado State University, 1999.

SUGKRAROEK, P., KATES, M., LEADER, A. et al. Levels of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and Percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. **Fertility and Sterility**, v.55, p.820–827, 1991.

SUÑÉ, A.I.C.P. Características seminais de equinos da Raça Crioula e fertilidade. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Pelotas, 38p, 2001.

TERRACIANO, P.B., BUSTAMANTE FILHO, I.C., MIQUELITO, L.V., ARLAS, T.R., CASTRO, F. MATTOS, R.C., PASSOS, E.Q., OBERST, E.R., CIRNE LIMA, E.O. Criopreservação de espermatozoides eqüinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. **Ciência Rural**, v.38, n.7, 2008.

TISCHNER, M.; KOSINIAK, K.; BIELANSKI, W. Analysis of the pattern of ejaculation in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.41. n.2, p. 329-335, 1974.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine response to semen deposition in the mare. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1995. **Proceedings**. San Antonio, Texas, 1995, p. 130-134.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, M.C. et al. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v 29, n.5, p. 1043-1054, 1988.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L. et al. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoa motility parameters. **Theriogenology**, v.28, n. 5, p. 709-723, 1987.

VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; BLANCHARD, T.L. et. al. Diseases and management of breeding stallions. **American Veterinary Publications**, p.343, cap.1, 1991.

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M. et. al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glicerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, v.48, p.907-917, 1997.

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M. et. al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glicerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, v.88, p.1-3, 2002.

VIDAMENT, M., VINCENT, P., YVON, J.M., MARTIN, F.X. Glicerol in semen extender is limiting factor in the fertility in asine and equine species. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p.105-13, 2005.

WANG, Y., SUNWOO, H., CHERIAN, G., DLIM, J.L. Fatty Acid determination in chicken egg yolk: A comparison of different methods. **Poultry Science**, v.79, p.1168-1171, 2000.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Development**, v.7, n.4, p.871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.322, 2001.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.639–658, 1993.

YANAGIMACH, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. **Zygote**, v.2, p. 371-372,1994.

YEAGLE, P.L. Cholesterol and the cell membrane. **Biochim. Biophys. Acta**, v.822, p.267–287, 1985.