

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**VIABILIDADE DO SÊMEN EQUINO ARMAZENADO EM UM SISTEMA DE  
POLIETILENO PARA TRANSPORTE POR ATÉ OITO HORAS**

**Autor: Alisson Ceccatto Maciel**

**PORTO ALEGRE**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**VIABILIDADE DO SÊMEN EQUINO ARMAZENADO EM UM SISTEMA DE  
POLIETILENO PARA TRANSPORTE POR ATÉ OITO HORAS**

**Autor: Alisson Ceccatto Maciel**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

**Orientadora: Profa. Dra. Sandra Fiala  
Rechsteiner**

**PORTO ALEGRE**

**2014**

CIP - Catalogação na Publicação

**Ceccatto Maciel, Alisson**

**Viabilidade do sêmen equino armazenado em um sistema de polietileno para transporte por até oito horas / Alisson Ceccatto Maciel. -- 2014-  
64 f.**

**Orientadora: Sandra Fiala Rechsteiner**

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Equino. 2. Sêmen Refrigerado. 3. Sistema Passivo de Refrigeração. I. Fiala Rechsteiner, Sandra, orient. II. Título.

ALISSON CECCATTO MACIEL

**VIABILIDADE DO SÊMEN EQUINO ARMAZENADO EM UM SISTEMA DE  
POLIETILENO PARA TRANSPORTE POR ATÉ OITO HORAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal: Equinos, na área de Reprodução Equina, sob a orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sandra Fiala Rechsteiner

APROVADO POR:

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sandra Fiala Rechsteiner

Orientadora e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

Membro da Comissão

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cely Marini

Membro da Comissão

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Anita Pimentel

Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelas bênçãos diárias concedidas na minha vida, pela saúde e determinação que sempre me foram dados, muito obrigado Senhor.

Aos meus pais, Adilton Maciel e Arleide Ceccatto, pela confiança depositada em mim, pelo amor, educação e valores que me ensinaram. À minha querida irmã, Andinara Ceccatto Maciel, que apesar da distância enfrentada durante estes anos de mestrado, jamais deixou de dar força e apoio sempre que precisei. Amo muito vocês.

À Marina Toso, minha namorada e melhor amiga, por sempre me dar confiança e força em minhas decisões.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Fiala, pela sua orientação, pela ajuda e ensinamentos. Obrigado pela atenção e paciência!

Ao Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos, por ter aberto as portas do Laboratório do Reprolab e contribuir fornecendo os animais para a realização deste experimento.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Medicina Animal: Equinos, sem os quais nada do aprendizado e lições vividas durante o mestrado seriam possíveis.

Aos colegas, bolsistas, estagiários e amigos do Reprolab, agradeço pelo aprendizado conjunto, pela boa convivência e pela amizade que, espero eu, seja duradoura.

E por fim, porém não menos importante, aos meus nobres amigos, que me fizeram chegar até aqui: OS CAVALOS!!

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível”,  
e de repente você estará fazendo o impossível ““.

(São Francisco de Assis)

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curva de refrigeração dos Sistemas de Polietileno Refrigerado (SP) e Não-Refrigerado (SPN).....	43
----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação do vigor.....	22
----------	-----------------------------	----



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
®	Marca Registrada
α	Alpha
β	Beta
%	Porcentagem
ANOVA	Análise de Variância
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CFDA	Diacetato de Carboxifluoresceína
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
h	Hora
H <sub>2</sub> O	Água
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kg	Kilograma
L	Litro
Min	Minuto
mL	Mililitro

mOsm	Miliosmol
MP	Membrana Plasmática
PI	Iodeto de Propídio
UHT	Ultra High Temperature
VA	Vagina Artificial
$10^6$	Milhões
$10^9$	Bilhões

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi testar um sistema de Polietileno para o transporte de sêmen equino refrigerado por um período de até oito horas. Foram utilizados um total de 87 ejaculados de cinco diferentes garanhões, com idade média de 10 anos, sendo três da raça Puro Sangue de Corrida e dois da raça Pônei Miniatura Brasileiro. Os garanhões foram coletados duas vezes por semana utilizando vagina artificial. Após cada coleta, o sêmen foi avaliado a fresco e diluído na proporção 1+1 (diluyente + sêmen) com leite desnatado UHT e dividido em quatro alíquotas de igual volume. No grupo controle (GC) o sêmen foi analisado logo após a diluição (zero hora – 0h). Nos demais grupos o sêmen foi mantido por oito horas (8h) em três diferentes sistemas de transporte: Equitainer<sup>®</sup> (GE), Botuflex<sup>®</sup> (GB) e Sistema de Polietileno - Refrigerado (SP) ou Não-Refrigerado (SPN). Foram avaliadas a motilidade total, vigor, a integridade de membrana plasmática (CFDA/PI), funcionalidade de membrana plasmática (HOST) e morfologia espermática. No SP não ocorreu diferença estatística em todos os parâmetros avaliados, quando comparado com o GE e o GB (médias da motilidade total = 45,00%, 49,29% e 46,40%; médias do vigor = 2,04, 2,18 e 2,01; médias do CFDA/PI = 71,12%, 73,29%, 71,32; médias do HOST = 39,70%, 41,21% e 39,76%; e médias da morfologia = 80,50%, 82,29% e 81,28%, valores respectivos de cada parâmetro para SP, GE e GB), enquanto o SPN apresentou valores médios inferiores ao GE para todos os parâmetros avaliados (médias da motilidade total = 50,65% e 62,60%; médias do vigor espermático = 1,78 e 2,43; médias do CFDA/PI = 72,56% e 78,30%; médias do HOST = 43,56% e 48,87%; médias da morfologia = 77,17% e 84,82%, respectivamente para SPN e GE). Com base nos dados podemos concluir que o SP foi igual ou não diferiu dos demais sistemas estudados, já o SPN se apresentou inferior aos demais sistemas estudados neste experimento. Portanto, o uso do SP é indicado para o transporte de sêmen refrigerado por oito horas, quando comparado aos demais sistemas estudados neste trabalho.

**Palavras-chave:** equino / sêmen refrigerado / sistema passivo de refrigeração

## ABSTRACT

The aim of this study was to test a polyethylene system to ship equine cooled semen. A total of 87 ejaculates from five different stallions with known fertility, mean age 10 years, were used, being three Thoroughbred and two Miniature Pony horse. The stallions were collected twice a week using an artificial vagina. After each collection the semen was diluted 1+1 (diluent+semen) with UHT skim milk and divided into four aliquots of equal volume, yielding a total of four groups. In the control group (CG) the semen was analyzed immediately after dilution (zero hour - 0h). In the other groups semen was stored for eight hours (8h) in three different transport systems: Equitainer<sup>®</sup> (EG), Botuflex<sup>®</sup> (BG) and Polyethylene System - Cooled (PS) or Non-Cooled (NPS). The total motility, vigor, plasma membrane integrity (CFDA/PI), plasma membrane functionality (HOST) and sperm morphology were evaluated. In PS did not occur a statistical difference in all parameters compared with EG and BG (averages of total motility = 45.00%, 49.29% and 46.40%, the average effect = 2.04, 2.18 and 2.01; averages CFDA / PI = 71.12%, 73.29%, 71.32; averages HOST = 39.70%, 41.21% and 39.76%, and the average of morphology = 80.50%, 82.29% and 81.28%, respective values of each parameter to PS, EG and BG), while the NPS showed lower mean values than the EG to all parameters (total motility averages = 50,65% and 62,60%, sperm vigor averages = 1,78 and 2,43; CFDA / PI averages = 72,56% and 78,30%; HOST averages = 43,56% and 48,87 %, morphology averages = 77.17% and 84.82%, respectively for NPS and EG). Based on the results we can conclude that the PS was equal or did not differ from the other systems studied, the NPS already performed lower than the other systems studied in this experiment. Therefore, the use of the SP is indicated for the transport of cooled semen for eight hours as compared to other systems studied in this work.

**Keywords:** equine / cooled semen / passive cooling device

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Célula Espermática.....	16
2.1.1. Características Estruturais.....	16
2.1.2. Membrana Plasmática.....	18
2.2. Métodos de Avaliação do Sêmen.....	20
2.2.1. Avaliação Macroscópica.....	21
2.2.2. Avaliação Microscópica.....	21
2.2.2.1. Motilidade Espermática e Vigor Espermático.....	21
2.2.2.2. Morfologia Espermática.....	23
2.2.2.3. Teste de Integridade de Membrana Plasmática .....	24
2.2.2.4. Teste de Funcionalidade de Membrana Plasmática – Teste Hiposmótico.....	26
2.3. Diluentes de Refrigeração.....	28
2.4. Refrigeração e Temperatura de Armazenamento do Sêmen.....	30
2.5. Sistemas de Refrigeração.....	32
3. ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO.....	34
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	38
Resultados.....	41
Discussão.....	43
Conclusão.....	47
Sources and Manufacturers.....	48
Referências Bibliográficas.....	48
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS.....	62

## 1. INTRODUÇÃO

O complexo do agronegócio do cavalo vem alcançando patamares nunca antes alcançados pela equideocultura nacional (GUERRA & MEDEIROS, 2007).

O agronegócio do cavalo ganha a cada ano maior espaço no mercado brasileiro, sendo uma importante atividade econômica e social. Este segmento movimenta 7,5 bilhões de reais/ano e gera aproximadamente 650 mil empregos diretos e cerca de 2,6 milhões de empregos indiretos (CNA, 2006) no campo e na cidade (LIMA et al., 2006). Segundo Teixeira (2011), somente no ano de 2010, o cavalo Crioulo atingiu a marca dos R\$100 milhões em vendas, valor este muito além do alcançado no ano de 2000, por exemplo, que foi de R\$9 milhões, o que mostra uma grande evolução econômica somente nesta raça.

As biotecnologias da reprodução são ferramentas importantes no que tange a equideocultura mundial e a inseminação artificial (IA) é um dos seus instrumentos mais importantes, com um maior impacto sobre a reprodução equina (LOOMIS, 2006). A IA em equinos é praticada em todo o mundo e é a base para outras biotecnologias que vão desde a transferência de embriões até a clonagem (AURICH, 2012). Na espécie equina, a maneira mais comumente usada desta biotecnologia é mediante a refrigeração e transporte de sêmen (LOOMIS, 2006), utilizado na reprodução equina desde o final da década de 80 (HECKENBICHLER et al, 2011). Segundo Papa et al. (2005), o Brasil é o segundo país no mundo que mais utiliza transporte de sêmen equino, ficando atrás apenas dos Estados Unidos.

Esta biotecnologia, além de segura e barata, evita a ocorrência de riscos decorrentes do transporte tanto de éguas como do próprio garanhão (AVANZI et al., 2006). Em contrapartida, a fertilidade do sêmen refrigerado é mantida por um período de 24 – 48 horas, sendo que após este tempo a taxa de prenhez diminui drasticamente (AURICH, 2008).

Atualmente existem diferentes metodologias e tipos de sistemas refrigerados para o transporte de sêmen, porém ainda é muito comum para os médicos veterinários o transporte de sêmen utilizando caixas de isopor.

Analisando o atual mercado de sistemas refrigerados para o transporte de sêmen, este estudo teve como objetivo geral testar um sistema de Polietileno para o transporte de sêmen equino refrigerado por um período de até oito horas, tendo como objetivo específico o de comparar os valores encontrados neste sistema com outros dois sistemas já utilizados comercialmente.



## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. CÉLULA ESPERMÁTICA**

A forma geral do espermatozoide foi descrita pela primeira vez por van Leeuwenhoek há mais de 330 anos atrás (1677) (VARNER & JOHNSON, 2011). Segundo estes mesmos autores, foram necessários cerca de 200 anos para a aceitação de que esta forma de girino contribuía para a fertilização.

A espermatogênese ocorre no interior dos túbulos seminíferos dos testículos, onde as espermatogônias multiplicam-se através de mitoses, transformando-se em espermatócitos primários. Os espermatócitos primários sofrem meiose, dando origem a duas células haplóides chamadas de espermatócitos secundários, que sofrem outra meiose, originando quatro células haplóides, chamadas de espermátides, que darão origem ao espermatozoide (EDDY, 2006). Segundo Meyers (2009), a espermatogênese é composta por três fases: (1) espermatogênese (divisões mitóticas de espermatogônias), (2) meiose e (3) espermiogênese (maturação e diferenciação das espermátides), com uma duração total de aproximadamente 57 – 58 dias em garanhões.

Para que ocorra a fertilização do oócito, o espermatozoide deve desenvolver e manter pelo menos cinco atributos gerais (AMANN & PICKETT, 1987): 1) proteínas na membrana plasmática que são essenciais para a sobrevivência do espermatozoide no trato genital feminino; 2) metabolismo para produção de energia; 3) motilidade progressiva; 4) acoplamento do espermatozoide à membrana do oócito no momento da fertilização; 5) enzimas localizadas no acrossoma, que são essenciais para a penetração do espermatozoide nas estruturas periféricas do oócito.

#### **2.1.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS**

A célula espermática equina, como a de outros mamíferos, é uma célula altamente especializada, constituída por uma cabeça, uma peça intermediária, uma peça principal, e uma peça final (MEYERS, 2009), contendo a membrana plasmática cobrindo toda a célula (MORTIMER, 1997).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozoide está voltada para a sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no

núcleo do espermatozoide para o oócito, onde a união dos pronúcleos masculino e feminino ocorre, produzindo o zigoto (EDDY, 2006).

A cabeça contém um núcleo com DNA, com o material genético, e o acrossoma contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração no oócito durante a fertilização (AMANN & GRAHAM, 1993). Além do núcleo e do acrossoma, a cabeça contém ainda estruturas do citoesqueleto e uma pequena quantidade de citoplasma (EDDY, 2006). O núcleo é extremamente condensado e, provavelmente, contém pouca quantidade de água, restando como localização para este líquido apenas os espaços entre as membranas plasmática e acrossomal externa, ou dentro de estruturas como o acrossomo e a mitocôndria (AMANN & PICKETT, 1987).

A extremidade anterior do núcleo do espermatozoide é recoberta pelo acrossomo, que é uma fina cobertura com dupla camada de membranas que envolve intimamente o núcleo durante os últimos estágios de formação do espermatozoide (HAFEZ & HAFEZ, 2003). O acrossoma é originário do complexo de Golgi na espermátide, que contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração da matriz extracelular do oócito (zona pelúcida) para completar a fertilização (FLESCH & GADELLA, 2000). Os componentes do citoesqueleto estão alojados nos espaços estreitos entre o acrossoma e o núcleo e entre o acrossomo e a membrana plasmática (EDDY, 2006).

Esta estrutura membranosa se dispõe sobre o núcleo como uma capa na porção anterior da cabeça do espermatozoide, sendo dividida em membrana acrossomal interna e membrana acrossomal externa; a membrana interna fica em contato com a membrana nuclear, enquanto a membrana externa fica em contato com o lado interno da membrana plasmática (FLESCH & GADELLA, 2000).

O acrossoma consiste de dois segmentos: a capa acrossomal (acrossoma anterior) e o segmento equatorial (acrossoma posterior), sendo que o segmento equatorial é a parte que, juntamente com a porção anterior da região pós-acrossômica, inicialmente se funde com a membrana do oócito durante a fertilização (HAFEZ & HAFEZ, 2003).

A peça intermediária é a região da cauda entre o colo e o *annulus* (HAFEZ & HAFEZ, 2003). Ela contém um arranjo helicoidal de mitocôndrias, as quais geram energia para o batimento flagelar (MORTIMER, 1997).

A peça principal do flagelo se estende do *annulus* até a peça terminal da cauda, e é composta centralmente pelo axonema e sua associação de fibras grosseiras, que fornece a estabilidade dos elementos contráteis da cauda (HAFEZ & HAFEZ, 2003).

A peça terminal contém somente o axonema coberto pela membrana plasmática (MORTIMER, 1997).

A cauda é composta por uma região chamada de “colo” (ligada à cabeça), pela peça intermediária, que contém elos de mitocôndrias, pela peça principal, que contém bainhas fibrosas, e pela peça final, que contém microtúbulos (AMANN & GRAHAM, 1993). A cauda fornece a força de motilidade que é essencial para impulsionar o espermatozoide através do trato genital feminino para chegar ao local de fertilização na ampola do oviduto da fêmea (MEYERS, 2009).

Internamente, o flagelo é constituído pelo axonema, uma estrutura especializada do citoesqueleto, responsável pela motilidade espermática, sendo formado por nove microtubulos duplos, localizados na periferia do cilindro e por dois microtubulos simples centrais (MORTIMER, 1997). Estes microtúbulos são organelas cilíndricas compostas por heterodímeros de tubulinas  $\alpha$  e  $\beta$ , arranjados da cabeça em sentido a cauda, para formar um protofilamento polar. (BRINKLEY, 1997).

Externamente ao axonema, a fibra densa possui córtex e uma medula, e é constituída por proteína semelhante à queratina, o que confere elasticidade ao flagelo. O comprimento das fibras varia se estendendo acima de 60% do comprimento da peça intermediária do flagelo, com duas fibras mais curtas, três fibras de comprimento médio e quatro fibras longas, sendo que esta assimetria no comprimento das fibras densas pode desempenhar papel importante na alteração progressiva do plano de batimento flagelar (MORTIMER, 1997).

Desta forma, a função principal da cabeça do espermatozoide é a liberação de uma série haplóide de cromossomos para o oócito, enquanto que, a do flagelo, é promover a motilidade da célula para permitir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e a penetração através da zona pelúcida do oócito (MORTIMER, 1997).

### **2.1.2. MEMBRANA PLASMÁTICA**

Todas as células (procariontes ou eucariontes) são circundadas por uma membrana plasmática que define a sua delimitação, separando seu conteúdo do meio que a circunda. Por servir de barreira seletiva, a membrana plasmática determina a composição do citoplasma celular, tendo papel fundamental na maioria dos fenômenos celulares (SINGER & NICOLSON, 1972).

As membranas (plasmática, nuclear, acrossomal e mitocondrial) da célula espermática são agregados de lipídios e proteínas construídos durante a espermatogênese, e modificadas

durante o trânsito e armazenamento no epidídimo e ejaculação. A função das membranas é determinada pela intervenção de seus vários componentes; desse modo, algum evento que modifique estas interações, pode alterar sua função (HAMMERSTEDT et al., 1990).

A membrana plasmática é formada por duas camadas lipídicas, contendo moléculas de fosfolipídios polares de propriedades anfipáticas e distribuídas assimetricamente, orientadas de maneira que a porção hidrofóbica fique direcionada para o centro da membrana e a porção hidrofílica direcionada para a superfície da membrana. Os principais lipídios presentes nesta estrutura celular são os fosfolipídios (colina, serina, glicerol e inositol), glicosfingolipídios e esteroides (FLESCH & GADELLA, 2000).

Além da bicamada lipídica, a membrana plasmática é composta também por proteínas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um mosaico fluido (SINGER & NICOLSON, 1972). As proteínas podem ser classificadas em duas classes: proteínas integrais à membrana - as quais são essenciais para a estrutura da membrana - e proteínas periféricas – associadas à membrana, porém facilmente removíveis (AMANN & GRAHAM, 1993).

Essas estruturas proteicas são encontradas desigualmente distribuídas na membrana plasmática, entre diferentes regiões da cabeça e outras partes do espermatozoide, atuando como bombas de cálcio, sódio e outros íons, ou ainda como receptores associados a interações ao oócito durante o processo de fertilização (AGUAS & PINTO, 1983).

As membranas plasmáticas espermáticas seguem o modelo clássico de membrana plasmática. Entretanto, a membrana plasmática dos espermatozoides dos mamíferos apresenta-se organizada em domínios regionais bem delineados que diferem em composição e função, e que apresentam características dinâmicas que passam por mudanças na organização e composição durante a vida da célula (WOLFE et al., 1998).

Na célula espermática madura podem-se identificar três regiões altamente especializadas da membrana plasmática: a cabeça do espermatozoide, a peça intermediária e o flagelo (FLESCH & GADELLA, 2000).

Na cabeça do espermatozoide, a membrana plasmática possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-acrossomal. Na região acrossomal, a membrana plasmática pode ser subdividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial. Os segmentos marginal e principal, juntos, são denominados de capa acrossomal. A membrana plasmática do flagelo é separada em domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial, e domínio da cauda posterior, que cobre as peças principal e terminal da cauda (EDDY, 2006).

As interações entre proteínas e lipídios que ocorrem dentro da membrana são extremamente importantes para o desempenho das funções celulares. Alguns lipídios são preferencialmente agrupados ao redor de proteínas integrais e o ambiente lipídico ao redor de uma proteína influencia as propriedades funcionais desta unidade agregada (HAMMERSTEDT et al., 1990).

A membrana plasmática tem permeabilidade seletiva e atua como uma barreira, mantendo, assim, diferenças de composição entre o interior e o exterior da célula, pois danos nesta estrutura podem levar a perda da homeostase com posterior morte da célula (AMMAN & PICKET, 1987).

## **2.2. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO SÊMEN**

A avaliação *in vitro* do sêmen é de grande importância para a análise das características relacionadas com a capacidade fecundante do espermatozoide, tais como: motilidade, integridade morfológica, integridade da membrana plasmática e funcionalidade de membrana (TERRACIANO, 2008).

O objetivo da avaliação do sêmen é conhecer o número de células estrutural e funcionalmente normais, o que está relacionado com a capacidade fecundante do sêmen (HAFEZ & HAFEZ, 2003), bem como avaliar com uma maior acurácia se o sêmen de um garanhão é capaz de ser submetido a procedimentos como a refrigeração e o congelamento (MAGISTRINI, 2000).

O desenvolvimento de ensaios laboratoriais para predizer com acurácia a capacidade fertilizante do sêmen tem instigado há muitos anos os pesquisadores, uma vez que, para serem capazes de fertilizar o oócito e permitir o desenvolvimento embrionário, os espermatozoides precisam apresentar diversos atributos (GRAHAM et al., 1990).

Embora os testes laboratoriais não determinem a fertilidade real de uma amostra de sêmen, eles permitem predizer quais amostras são mais prováveis de possuir baixa fertilidade (AMANN, 1989).

Sabe-se que as análises das características seminais assumem um papel decisivo na determinação da fertilidade do garanhão, particularmente na sua eficiência reprodutiva, sendo que a capacidade de prever a fertilidade futura é muito melhorada sempre que os vários testes sejam utilizados em combinação (VARNER, 2008).

Da mesma maneira, Celeghini et al. (2007) descrevem que a manutenção do potencial de fertilização do espermatozoide depende da integridade e funcionalidade das diferentes estruturas celulares, o que, na prática, reflete na dificuldade de desenvolver um teste laboratorial isolado para prever, com exatidão, o potencial de fertilidade do sêmen.

### **2.2.1. AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA**

Uma avaliação geral da coloração, volume, odor e aspecto do sêmen fresco pode fornecer informações relevantes e não pode ser ignorada antes de dar continuidade aos procedimentos de avaliação do sêmen (BAUMBER-SKAIFE, 2011).

A avaliação macroscópica do ejaculado permite observar algumas características que, somadas àquelas observadas na microscopia, são de suma importância na análise dos parâmetros seminais. Dentre as características macroscópicas mais comumente utilizadas na avaliação do sêmen equino estão o volume, o odor e a coloração (CBRA, 2013).

Durante ou imediatamente após a coleta, o sêmen é filtrado para remover a fração gel e quaisquer debris presentes na amostra (BEDFORD-GUAUS, 2007). Sendo assim, após ser filtrado, o volume de sêmen é geralmente dividido em duas frações: a fração gel e a fração livre de gel (BAUMBER-SKAIFE, 2011). O volume de sêmen ejaculado pode variar de acordo com a espécie, raça, idade, clima e regime de coletas. Não existe um limite mínimo ou máximo para o volume, sendo que, para a espécie equina, o volume (livre de gel) apresenta um valor médio de 40 - 60 ml (CBRA, 2013).

O odor característico do sêmen é o “sui generis” (CBRA, 2013), sendo que a coloração do sêmen fresco deve ser branca acinzentada (BAUMBER-SKAIFE, 2011). Porém, esta coloração pode variar, dependendo da eventual presença de sangue, pus, urina, células epiteliais, sujidades, entre outros (CBRA, 2013).

### **2.2.2. AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA**

#### **2.2.2.1. MOTILIDADE ESPERMÁTICA E VIGOR ESPERMÁTICO**

A motilidade espermática é um dos principais métodos de avaliação de espermatozoides, e constitui um elemento importante na estimativa da viabilidade espermática (PICKETT, 1993), tendo sido considerada um dos principais critérios na avaliação da fertilidade do macho (MALMGREN, 1997). Sua manutenção não implica em

integridade celular completa; entretanto, sua perda irreversível resultaria na perda da função celular (VARNER et al., 1988).

De acordo com Magistrini (2000), o espermatozoide necessita de motilidade para ultrapassar a junção útero-tubárica e as células que circundam o oócito.

A avaliação da motilidade espermática é frequentemente realizada através de meio visual, com a utilização de um microscópio óptico (VARNER et al., 1991). Para esta avaliação, coloca-se uma pequena gota de sêmen entre lâmina e lâminula, com posterior observação no microscópio, que deve conter uma banca aquecedora mantida a 37° (HAFEZ, 1995). Este método permite determinar, de forma subjetiva, uma estimativa da porcentagem de espermatozoides com movimento em um ejaculado (CBRA, 2013), bem como o vigor destes movimentos (MIES FILHO, 1975).

O vigor espermático é um parâmetro normalmente avaliado em conjunto com a motilidade espermática (CARDOSO et al., 2005), onde se estima a intensidade do movimento espermático, sendo classificado de 1 a 5, conforme Tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Classificação do vigor

Score	Definição
5	Progressivo retilíneo e muito rápido
4	Progressivo retilíneo rápido
3	Intermediário
2	Lento
1	Exclusivamente oscilatório

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013.

Entende-se por motilidade progressiva a porcentagem de células que estão se movimentando ativamente para frente. Incluem-se, também, os espermatozoides com movimentos circulares amplos, devido à alta incidência de implantações abaxiais do colo na espécie equina (BIELANSKI & KACZMARSKI, 1979).

Devido a isto, as avaliações de motilidade e vigor, por meio visual, são consideradas como um método subjetivo, mesmo quando feita por técnicos bem treinados (ROTA et al., 2004). Porém, segundo Varner et al (1988), este método subjetivo de exame visual utilizando um microscópio óptico e platina aquecida é aceitável, tendo como desvantagem que as estimativas da motilidade e vigor podem variar entre os examinadores (MALMGREN, 1997).

Atualmente tem-se utilizado métodos de avaliação mais objetivos, onde se emprega um microcomputador para a avaliação da cinética espermática, associado a uma vídeo-câmera e com um hardware especial, o qual recebe o nome de CASA (Computer-assisted sperm analysis), ou seja, Análise Espermática Assistida por Computador (AMANN & WABERSKI, 2014). Além da análise computadorizada (CASA), outros métodos foram descritos para se estimar, de forma objetiva, a motilidade espermática, como por exemplo, a Espectrofotometria (JASKO et al., 1989).

Segundo o CBRA (2013), o sêmen estará dentro dos padrões desejáveis para efeito de seleção de garanhões para monta natural quando apresentar uma motilidade espermática de  $\geq 60\%$  e um vigor  $\geq 3$ , e padrões desejáveis para sêmen refrigerado quando apresentar motilidade espermática  $\geq 50\%$  e um vigor  $\geq 3$ .

#### **2.2.2.2. MORFOLOGIA ESPERMÁTICA**

De acordo com Meyers (2009), a avaliação da morfologia espermática é uma parte importante de qualquer exame andrológico.

A avaliação isolada da morfologia espermática pode não indicar se o potencial de fertilidade do ejaculado é alto, mas pode indicar se o potencial de fertilidade é baixo, principalmente quando houver altas porcentagens de anormalidades espermáticas de primeiro e segundo grau (DOTT, 1975).

A forma do espermatozoide pode ser alterada durante vários estágios da sua vida, e as causas destas deformidades podem agir num estágio específico do desenvolvimento espermático, ou ocorrer durante o seu transporte, após atingir a sua maturidade. As possíveis causas destas alterações podem estar presentes na espermatogênese, na maturação do gameta, ou durante e após a ejaculação (DOTT, 1975).

Ao menos 100 células espermáticas devem ser avaliadas para se observar a evidência de defeitos morfológicos, sendo que o tipo e a incidência de cada defeito deve ser anotada, (VARNER, 2008).

As alterações morfológicas do espermatozoide equino podem ser divididas em primárias, secundárias (BIELANSKI, 1975; VARNER, 2008) ou terciárias (VARNER, 2008). As alterações primárias estão associadas com defeitos na espermatogênese, portanto, são de origem testicular, e as alterações secundárias ocorrem durante o percurso pelos ductos, epidídimo e durante ejaculação (BIELANSKI, 1975). Já as alterações terciárias, ao contrário dos dois tipos anteriores, se desenvolvem *in vitro*, como resultado de procedimentos



inadequados durante a coleta ou manipulação do sêmen (VARNER, 2008). De acordo com Bielanski (1975), a presença de mais de 10% de anormalidades primárias, no ganhão, está relacionada à baixa fertilidade, enquanto ganhões apresentando somente anormalidades secundárias, mesmo superando 30% de alterações em um ejaculado, não apresentam necessariamente baixa fertilidade.

Segundo Meyers (2009), certos defeitos espermáticos são mais importantes ou mais prejudiciais à fertilidade do que outros, portanto, apenas o defeito mais prejudicial é anotado.

Alguns estudos têm descrito alguma relação entre as características morfológicas do espermatozoide com seu potencial de fertilidade (BIELANSKI & KACZMARSKI, 1979; BIELANSKI et al., 1982; LOVE, 2011). A porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais apresenta uma correlação positiva com a motilidade espermática (VARNER, 2008).

### **2.2.2.3. TESTE DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA**

Todos os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a predição da capacidade fertilizante do sêmen. Dentre esses exames, a técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural e funcional de forma clara (CELEGHINI, 2005), além de possibilitar a avaliação de vários compartimentos celulares ao mesmo tempo (CELEGHINI et al., 2007).

Segundo Foster et al. (2011), a integridade de membrana dos espermatozoides é considerada uma importante medida de qualidade espermática no ganhão, e a qualidade do espermatozoide está intimamente relacionada com o estado da membrana plasmática, pois tal membrana não serve apenas como um limite da célula, mas atua também nas interações célula-célula.

Devido a isto, várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas, de forma isolada ou combinadas, quando se pretende avaliar a integridade da membrana plasmática do espermatozoide, como, por exemplo, o Diacetato de Carboxifluoresceína e o Iodeto de Propídio (GARNER et al, 1986; HARRISON & VICKERS, 1990), corantes supravitais Hoechst 33258 (H258) (CASEY et al., 1993) e 33342 (H342) (MAXWELL et al., 1996), SYBR-14 (GARNER et al., 1994), eosina-nigrosina (CHALAH & BRILLARD, 1998) e o Brometo de Etídio (PETERSON et al., 1974).

Garner et al. (1986) descreveram o uso de duas colorações fluorescentes, em conjunto ou separadamente, o Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e o Iodeto de Propídio (PI), para avaliar a integridade de membrana plasmática de suínos, bovinos, caninos, equinos, camundongos e humanos. Segundo Garner et al. (1986), a combinação do CFDA com o PI permite avaliar a integridade da membrana plasmática devido às suas características moleculares. É proposto por estes autores que o CFDA, que é um fluoróforo penetrante à membrana plasmática, consegue transpor a membrana intacta por conter radicais acetil. Pela ação de esterases intracelulares, os radicais são imediatamente desacetilados e a sonda se torna impermeável, fazendo com que as células íntegras corem-se de verde. No entanto, o PI, um fluorocromo que se liga ao DNA celular, penetra somente através de células que contenham membrana plasmática lesada, tendo afinidade pelo DNA e corando o núcleo da célula em vermelho (GRAHAM et al., 1990).

Como resultado deste método, os espermatozoides com membrana íntegra apresentam fluorescência verde, já os espermatozoides com lesão na membrana apresentam o núcleo vermelho fluorescente (HARRISON & VICKERS, 1990). Estes mesmos autores ainda afirmam que a utilização conjunta do CFDA com o PI é considerada mais segura para avaliar a integridade de membrana do que a utilização isolada destes corantes e propuseram adaptações às técnicas de coloração com sondas fluorescentes, facilitando a visualização dos espermatozoides em microscópio de epifluorescência e o aumento da aplicabilidade a partir da adição de concentrações baixas de formaldeído para a imobilização dos espermatozoides durante a avaliação.

A única desvantagem desta técnica de coloração é a necessidade de realizá-la o mais rápido possível após a aplicação do corante, pois a coloração se perde devido à passagem dos compostos fluorescentes através da membrana (JOHNSON et al., 1996).

Uma técnica de coloração acrossomal para o espermatozoide equino foi desenvolvida por Casey et al. (1993), a qual pode diferenciar os espermatozoides vivos dos mortos. Segundo estes autores, a aglutinina *Pisum sativurum* (PSA), um fluorocromo fluoresceinado, foi usada para identificar a presença ou ausência de conteúdo acrossomal, enquanto o corante nuclear supravital Hoechst 33258 (H258) foi usado para estimar sua viabilidade, sendo que a ausência de H258 no núcleo é tido como evidência de que a célula espermática apresenta uma membrana intacta.

O Hoechst 33342 é um corante sintético, a base de fluorocromo, utilizado rotineiramente para mensurar DNA nos cromossomos X e Y, existentes nos espermatozoides dos mamíferos (GARNER, 2009). A molécula permeia a membrana celular e liga-se

seletivamente aos pares de base A-T da dupla cadeia de DNA, corando células vivas (GARNER, 2009). Maxwell et al., em 1996, relataram o uso do Hoechst 33342 no touro, carneiro e varrão.

O SYBR-14 é um corante de ácidos nucleicos permeável à membrana, o qual cora o DNA (fluorescência verde brilhante) apenas de células vivas, sendo proposto seu uso de forma isolada ou também associada ao PI (GARNER et al., 1994). Esse método associado revela tanto espermatozoides viáveis quanto mortos, dentro de uma mesma preparação (GARNER et al., 1994).

O procedimento utilizando uma associação única de eosina/nigrosina baseia-se no grau de permeabilidade da membrana de espermatozoides mortos, nos quais a cabeça adquire a coloração rosa (eosinofílica), enquanto que a baixa permeabilidade da membrana de espermatozoides vivos exclui a eosina, mantendo, portanto, a coloração esbranquiçada das cabeças dos espermatozoides, enquanto a nigrosina assegura um contraste adequado das preparações (CHALAH & BRILLARD, 1998).

O Brometo de Etídio, outra sonda fluorescente, também tem sido usado para revelar a integridade de membrana em espermatozoides pelo fato do mesmo apenas penetrar em membranas danificadas (PETERSON et al., 1974). Quando adicionado em uma suspensão espermática, o brometo de etídio se liga quase que exclusivamente na cabeça do espermatozoide e induz uma intensa fluorescência (EDELMAN & MILLETTE, 1971).

#### **2.2.2.4. TESTE DE FUNCIONALIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA – TESTE HIPOSMÓTICO (HOST)**

As membranas biológicas são as responsáveis pela homeostase celular através de suas trocas com o meio externo (DELL'AQUA et al., 2002).

Quando exposta a condições hiposmóticas, a água entrará no espermatozoide numa tentativa de alcançar o equilíbrio osmótico, tendo como consequência um aumento do volume da célula espermática e a membrana plasmática irá inchar (MALMGREN, 1997), o que indica que a membrana plasmática está funcional.

A cauda é particularmente susceptível a esta condição, torcendo-se de forma helicoidal. Esta situação é facilmente observada com um microscópio de contraste de fase, sendo suficiente contar 100 espermatozoides para validar o teste (JEYENDRAN et al., 1984).

A primeira utilização do teste hiposmótico (HOST) foi realizada por Jeyendran et al. (1984), com a intenção de analisar a função bioquímica da membrana plasmática intacta da célula espermática. O HOST é realizado com o intuito de observar a reação do espermatozoide que, com sua membrana plasmática íntegra, quando colocado em uma solução hiposmótica, ocorre o influxo de água através da membrana, até que seja restabelecido o equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelular (JEYENDRAN et al., 1984). Com esta passagem de água para o interior da célula espermática ocorre um aumento do volume celular, ocasionando assim o dobramento da cauda (JEYENDRAN et al., 1984).

Melo & Henry (1999) observaram que soluções com osmolaridade acima de 250 mOsmol/kg H<sub>2</sub>O promoveram menores percentuais de reação hiposmótica nos espermatozoides devido ao fato deste valor ser muito próximo ao valor da osmolaridade do plasma seminal. Nie & Wenzel (2001) verificaram o mesmo no sêmen equino.

Jeyendran et al. (1984) realizaram o teste com sêmen humano, onde soluções com osmolaridades variando entre 50 a 300 mOsmol foram testadas, e obtiveram melhores índices de reações espermáticas quando da utilização de soluções com 150 mOsmol ou menos.

Em contrapartida, Pommer et al. (2002) avaliaram a resitência da célula espermática equina em diversas pressões osmóticas e observaram que osmolaridades inferiores a 150 e superiores a 900 mOsm/L podem ser prejudiciais à motilidade e à integridade da membrana plasmática.

Em relação à análise e contagem de células espermáticas, a quantidade varia de acordo com diferentes estudos. Jeyendran et al. (1984), ao contar 100 ou 200 células espermáticas humanas, não observou diferença significativa entre os valores contados. Nie & Wenzel (2001) também não observaram diferença entre as contagens de 100 e 200 e entre 100 e 500 espermatozoides (porcentagens de  $87,0 \pm 1,4$  x  $87,1 \pm 1,4$  e  $84,3 \pm 1,0$  x  $83,8 \pm 0,9$ , respectivamente).

Sabendo-se que a membrana plasmática está envolvida em trocas metabólicas com o meio, o estudo da sua funcionalidade é de grande importância, somado aos parâmetros tradicionais de avaliação da qualidade do sêmen, para determinar o potencial de fertilidade (JEYENDRAN et al., 1984).

### 2.3. DILUENTES DE REFRIGERAÇÃO

O sêmen é composto por células espermáticas e plasma seminal, o qual contém substâncias benéficas ao espermatozoide, mas não é um meio ideal para o armazenamento de espermatozoides equinos (JASKO et al., 1991; MOORE et al., 2005). Para se obter uma boa capacidade fertilizante do espermatozoide armazenado refrigerado, Varner et al. (1987) recomendam a adição de um diluente ao sêmen fresco.

A composição de um diluente pode aumentar a eficiência do sêmen equino refrigerado (FLORES-RODRIGUEZ et al., 2014). Os componentes de um diluente desempenham uma função fundamental na sobrevivência espermática em baixas temperaturas durante o processo de resfriamento, seja através da manutenção do meio ou através do efeito causado direta ou indiretamente sobre as membranas espermáticas (CRESPILHO et al., 2013).

O sêmen diluído tem como vantagens: a) o tratamento antibiótico presente em alguns diluentes, diminuindo assim a contaminação bacteriana; b) diluição de fatores tóxicos presentes no plasma seminal; c) melhora da fertilidade do sêmen devido ao aporte de nutrientes contidos no diluente; d) maior flexibilidade de inseminação, o sêmen pode ser transportado em curtas distâncias, sem prejuízo da fertilidade; e) a possibilidade do fracionamento para utilização em um maior número de éguas, pelo aumento do volume total (SQUIRES et al., 1999).

Os diluentes de sêmen são soluções destinadas a proteger os espermatozoides de condições ambientais desfavoráveis e a prolongar a sua sobrevivência (BRINSKO & VARNER, 1992). Estes também são utilizados para aumentar a viabilidade do sêmen de garanhões subférteis (BLANCHARD et al., 1987), e auxiliar na avaliação de amostras de sêmen (KENNEY et al., 1983).

Segundo Silva Filho (1994), um diluente ideal deve proporcionar: pressão osmótica compatível com o espermatozoide; apropriado equilíbrio mineral e adequada combinação de nutrientes; sistema com capacidade de neutralizar catabólitos espermáticos; substâncias com capacidade protetora para as variações de temperatura, principalmente para o frio; capacidade de estabilização de membranas e sistemas enzimáticos; ser livre de microrganismos patogênicos; ter baixo custo; não oferecer toxicidade ao espermatozoide; baixa irritabilidade ao aparelho genital e ser de fácil aquisição.

Os diluentes utilizados para sêmen equino são constituídos por água, tampões e substâncias não iônicas, açúcares e diferentes tipos de macromoléculas e antibióticos (SILVA

FILHO, 1994). A maioria dos diluentes usados para sêmen de equino é à base de gema de ovo, leite ou seus produtos derivados (SQUIRES et al., 1999).

Os diluentes mais utilizados para sêmen equino em todo o mundo, assim como no Brasil, são derivados do diluente de Kenney et al. (1975). Pode haver diluentes derivados deste meio com adição de diferentes tipos de constituintes como: antibióticos, outros açúcares, gema de ovo, aminoácidos, e outras substâncias com propriedades favoráveis ao sêmen (SAMPER, 2007).

A osmolaridade do sêmen equino é de aproximadamente 300 mOsm/L (PICKETT et al., 1976). A osmolaridade dos diluentes à base de leite deve estar em torno de 300 a 400 mOsm/L, sendo que a de 350 mOsm/L é considerada ótima (VARNER et al., 1991).

O leite é um dos ingredientes mais utilizados em diluentes de sêmen equino. As lipoproteínas do leite provavelmente agem de forma similar às da gema de ovo na proteção da membrana plasmática (AMANN & GRAHAM, 1993). Estas proteínas agem estabilizando as membranas dos espermatozoides, permitindo sua adaptação às baixas temperaturas (WATSON, 1981).

Ao testar a eficiência do leite desnatado como diluente de sêmen, Lagares et al. (2000) compararam a fertilidade do sêmen diluído em leite desnatado com o diluente Kenney, refrigerado a +5°C e armazenado por 24 horas, ou utilizado até uma hora após a coleta. Os índices de prenhez obtidos com o diluente leite desnatado (0h) foram 79,16%; com o leite desnatado armazenado por 24 horas a +5°C foram 62,5% e com diluente Kenney armazenado por 24 horas a +5°C foram 57%, demonstrando que não houve diferença significativa entre os dois diluentes ( $p > 0,05$ ).

Em outro estudo, Farrás et al. (2008) avaliaram a utilização de dois diluentes comerciais à base de leite desnatado (Botu-Sêmen® e Botu-turbo®), e um diluente à base de frações do leite (INRA96®) refrigerados em dois sistemas de resfriamento nacionais (Botutainer® e Botu-Box®). De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a motilidade total, motilidade progressiva e a integridade de membrana plasmática, durante os períodos de 6, 12 e 24 horas, em ambos os sistemas de refrigeração e nos três diluentes de refrigeração testados, não diferiram significativamente.

Segundo Batellier & Magistrini (2009), o INRA96® foi inicialmente desenvolvido para a refrigeração de soro do garanhão e seu armazenamento entre 4 e 15°C. Este diluente, o qual contém uma fração purificada de caseínas do leite, mostrou-se eficaz no congelamento das células espermáticas a -196°C, devendo, neste caso, ser complementada com agentes crioprotetores, como por exemplo, a gema de ovo e o glicerol, preservando assim, de forma

eficiente, a taxa de fertilidade após a inseminação artificial com sêmen congelado (BATELLIER & MAGISTRINI, 2009).

Em estudo realizado por Pillet et al. (2008), comparou-se o INRA96<sup>®</sup> com o INRA82, o qual tinha por objetivo verificar a eficiência do INRA96<sup>®</sup> complementado com gema de ovo e glicerol para o congelamento de sêmen equino. Após análises *in vitro* da motilidade e integridade da membrana plasmática pós-descongelamento das células espermáticas, os autores concluíram que o INRA96<sup>®</sup> complementado com gema de ovo e glicerol mostrou-se como um eficiente diluente para o congelamento de sêmen equino quando comparado com o diluente controle (INRA82).

Outros diluentes comerciais também são utilizados para a refrigeração de sêmen equino, como por exemplo o EZ Mixin<sup>®</sup>, que contém glicose e leite em pó seco sem gordura; o EquiPro<sup>®</sup> e o EquiPro<sup>®</sup> CellGuard<sup>™</sup> que contêm caseinatos, proteínas do soro do leite e os açúcares glicose e sacarose (LeFRAPPER et al., 2010).

#### **2.4. REFRIGERAÇÃO E TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DO SÊMEN**

A tecnologia do sêmen refrigerado é estudada com o intuito de se preservar o potencial fertilizante do sêmen equino por várias horas, pois à medida que o tempo de armazenamento aumenta, a fertilidade do sêmen diminui (BATELLIER et al., 2001).

A utilização do sêmen refrigerado possui vantagens, como a redução com os gastos inerentes ao transporte e à hospedagem de animais, a diminuição do estresse promovido pelo transporte dos animais e os riscos com acidentes e doenças resultantes da exposição a patógenos de um novo ambiente (BRINSKO & VARNER, 1992b).

O sucesso do uso do sêmen refrigerado depende de muitos fatores, que se confundem, como: temperatura de armazenamento, composição do meio diluente, dose inseminante, número de inseminações, qualidade do sêmen a fresco e manuseio do sêmen (MALMGREN, 1998).

A taxa de resfriamento tem fundamental importância na preservação espermática, sendo que taxas de resfriamento menores minimizam o choque térmico (AMANN & GRAHAM, 1993). Quanto mais baixa a temperatura de armazenamento, mais lenta deve ser a taxa de resfriamento, pois esta determina a sobrevivência espermática (PICKETT, 1993).

A refrigeração do sêmen pode ser feita em sistemas passivos ou ativos. Os sistemas passivos possuem a vantagem de apresentar custo reduzido, embora apresentem a desvantagem de proporcionarem taxas de refrigeração dependentes de fatores como

temperatura, ambiente, temperatura inicial da amostra, temperatura do produto refrigerante e a massa da amostra, produzindo taxas de resfriamento exponenciais e negativas (VALLE et al., 1999).

Já os sistemas ativos são caros, porém permitem taxas de resfriamento pré-determinadas pelo técnico, possibilitando combinar mais de uma taxa durante o processo (VALLE et al., 1999). Proporcionam, ainda, taxas de resfriamento lineares (KAYSER et al., 1992).

Segundo Silva Filho (1994), o sistema passivo de refrigeração do sêmen é o mais utilizado para equinos, sendo feito em dispositivos (*contâineres*) de refrigeração.

O sêmen diluído em sistemas de refrigeração passivo é mantido em caixas isotérmicas, próximo a uma fonte de frio (gelo biológico reciclável), que de acordo com o sistema deixará o sêmen refrigerado a 15 – 20°C, ou refrigerado a 4 – 6°C (KATILA, 1997).

As taxas ideais de refrigeração do sêmen equino foram demonstradas por Varner et al. (1988), onde observaram que estas taxas podem afetar a capacidade de manutenção da motilidade. Cinco condições de temperatura para o sêmen foram avaliadas: 1) mantida a 37°C, 2) resfriamento lento para 25°C, 3) resfriamento lento para 4°C, 4) resfriamento moderado para 4°C, e 5) resfriamento rápido para 4°C, avaliadas em: 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Após análise dos dados, estes autores observaram que não houve diferença estatística dentro da condição de resfriamento lento para 4°C, (taxa de -0,3°C/min.), nos sete intervalos de tempo observados para os padrões de motilidade total e a motilidade progressiva. A faixa de temperatura na qual o espermatozoide equino é mais sensível foi demonstrada por Kayser et al. (1992), estabelecendo que nos níveis de resfriamento de 37°C a 20°C, a uma taxa de resfriamento de -0,3°C/min, o sêmen pode ser refrigerado a altas taxas sem efeitos adversos para a motilidade, contudo, a faixa de 20° a 5°C, com uma taxa de resfriamento de -0,05°C/min, demonstrou-se como faixa de maior sensibilidade da célula espermática equina aos danos induzidos pelo resfriamento. Em adição ao experimento anterior, Moran et al. (1992) acrescentam o intervalo de temperatura de 19°C a 8°C, a uma taxa de resfriamento de -0,05°C/min, como sendo realmente a faixa de maior sensibilidade da célula espermática equina.

Em seu estudo, Province et al. (1985) testaram o efeito das temperaturas de armazenamento de +5°C, +10°C, +15°C e +20°C sobre a motilidade espermática, nas 36 horas após a diluição do sêmen em diferentes tipos de diluentes. As temperaturas de +15°C e +20°C foram significativamente melhores do que as demais testadas para se preservar a motilidade espermática. Todavia, estes resultados contradizem os relatados por Keller (1998),



que demonstrou ser a temperatura de +5°C a melhor na preservação da motilidade espermática por 72 horas de armazenamento com o sêmen diluído em Leite Desnatado, Tyrode e Glicina. Ainda, neste mesmo trabalho, a temperatura de armazenamento de +20°C provocou uma diminuição da motilidade com os diluentes testados já nas primeiras 24 horas de armazenamento, tornando os espermatozoides imóveis nas 48 horas de armazenamento.

Segundo Batellier et al. (2001), o armazenamento do sêmen a 15°C pode prevenir os danos à membrana plasmática causados pelo choque térmico pelo frio, principalmente para o sêmen de garanhões que não respondem bem à refrigeração.

## 2.5. SISTEMAS DE REFRIGERAÇÃO

As características de um bom *container* de transporte de sêmen equino devem seguir algumas condições como: completo isolamento ambiente; baixo custo; ser inócuo para os espermatozoides; manutenção da temperatura para o período proposto; realização de curva de resfriamento lento; ser aceito pelos sistemas de transporte aéreo e terrestre; seguro contra violações; entre outras situações adversas (SILVA FILHO, 1994; PALHARES, 1997).

Existem diversos modelos de recipientes refrigerados para o transporte de sêmen equino, nacionais e internacionais, com diferentes taxas de refrigeração, temperatura final e tempo máximo de armazenamento.

Dentre os modelos internacionais, podemos citar: Equitainer I® e II® (Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA, USA); Expecta Foal® (Expecta, Parker, CO, USA); Bio Flite®; Lane STS®; Equine Express® (MP&J Associates, DeMoines, IA, USA); Foal Flight®; Celle®(VALLE et al., 1999); Sarstedt®; Salsbro Box® (RAPHAEL, 2007).

O Equitainer® é o sistema de refrigeração mais conhecido. Sua taxa de refrigeração inicial é de aproximadamente -0,3°C/min., mantendo uma temperatura final de aproximadamente 4° - 6°C, por período superior a 36 horas. Apesar de ser muito resistente e poder ser reutilizado, seu alto custo de aquisição e a necessidade de retorno ao haras de origem, podem dificultar sua utilização (BRINSKO et al., 2000).

Entre os modelos nacionais, podemos citar: Botu-Box®, Botutainer® e BotuFLEX®, fabricados pela Botupharma Biotecnologia Animal; Max Sêmen Express®, que é revendido pela E.H.G. Agrofarma. O Botu-Box® e Max Sêmen Express® têm temperatura final de aproximadamente 15°C e tempo máximo de armazenamento de 24h, enquanto o Botutainer® tem temperatura final de aproximadamente 5°C e tempo máximo de armazenamento de 48h. (RAPHAEL, 2007), e o BotuFLEX® tem temperatura final tanto de 15°C como 5°C.

Katila et al. (1997) compararam três containers comumente utilizados para o transporte de sêmen refrigerado (Equitainer®, ExpectaFoal® e um container sueco para transporte de sêmen, previamente chamado de “Salsbro Box”, e posteriormente chamado de Equine Express®). Neste estudo, o sêmen foi armazenado por 24 horas nos respectivos containers, e a motilidade espermática avaliada após este período de armazenamento. Os autores observaram que não houve diferença em nenhum dos containers estudados, tanto na porcentagem de motilidade total ( $71,6 \pm 5,0\%$ ;  $71,9 \pm 4,0\%$  e  $75,1 \pm 5,1\%$ ) nem na motilidade progressiva ( $61,2 \pm 6,0\%$ ;  $63,3 \pm 4,8\%$  e  $65,2 \pm 5,4\%$ ), respectivamente para o Equitainer®, ExpectaFoal® e Equine Express®.

Em outro estudo, Malmgrem (1998) comparou dois diferentes containers para transporte de sêmen equino: o Equitainer® e o Salsbro Box®. Foi comparada a eficiência de ambos os containers em manter a qualidade do sêmen durante 24 horas de armazenamento, sob duas temperaturas diferentes:  $20^{\circ}\text{C}$  (temperatura ambiente) e  $37^{\circ}\text{C}$  (câmara de calor). Observou-se então que, após o armazenamento a  $20^{\circ}\text{C}$ , não houve diferença na motilidade total ( $55,3 \pm 26,6\%$  e  $57,7 \pm 23,3\%$ ) respectivamente para o Salsbro Box® e o Equitainer®, corroborando com o que Katila et al. (1997) observaram em seu estudo realizado com estes mesmos containers. Porém, após o armazenamento a  $37^{\circ}\text{C}$ , pelas mesmas 24 horas, Malmgrem (1998) observou que apenas a motilidade progressiva não apresentou uma diferença quando se comparou o Salsbro Box® e o Equitainer® ( $63,7 \pm 15,4\%$  e  $63,6 \pm 17,0\%$ , respectivamente).

Em estudo onde se avaliou a viabilidade espermática utilizando quatro sistemas de armazenamento e transporte de sêmen equino refrigerado (Botu-Box®, Botutainer®, Equitainer® e MaxSemenExpress®), mantidos em temperatura ambiente de 24 e  $40^{\circ}\text{C}$  por um período de 24 horas – com amostras avaliadas nos tempos de 6, 12 e 24 horas – Avanzi et al. (2006) observaram que não houve diferença ( $P > 0,001$ ) nos parâmetros avaliados (motilidade total, motilidade progressiva e integridade de membrana) nos diferentes tempos de avaliação e entre os diferentes sistemas de armazenamento, na temperatura de  $24^{\circ}\text{C}$ . Entretanto, na temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , os mesmos observaram que, após as 24 horas, o MaxSemenExpress® e o Botu-Box® apresentaram valores de motilidade total e integridade de membrana plasmática inferiores em comparação com o Equitainer® e o Botutainer®, concluindo que estes últimos dois sistemas apresentam eficiência similar no que diz respeito a manutenção adequada da viabilidade espermática durante armazenamento por 24 horas em temperatura ambiente de 24 e  $40^{\circ}\text{C}$ .

1 **3. ARTIGO A SER ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO**

2 **Artigo a ser submetido à Acta Scientiae Veterinariae**

3

4 **VIABILIDADE DO SÊMEN EQUINO ARMAZENADO EM UM SISTEMA DE**  
5 **POLIETILENO PARA TRANSPORTE POR OITO HORAS**

6

7 **Viability of equine semen stored in a polyethylene system for transport for eight hours**

8

9 **MACIEL, A. C.<sup>1</sup>; CAMARGO, V. A.<sup>2</sup>; FIALA RECHSTEINER, S.<sup>3</sup>**

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19 <sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos– Reprolab - UFRGS – Porto  
20 Alegre – RS – Brasil – Contato – email: acm\_medvet@hotmail.com ou endereço: Rua  
21 Marechal Arthur da Costa Silva, n. 74, bairro Coral, Lages/SC, CEP 88509-600

22 <sup>2</sup> Acadêmico Medicina Veterinária – UFRGS – Porto Alegre – RS – Brasil

23 <sup>3</sup> Professora Adjunta –HISTOREP - Departamento de Morfologia - IB/UFPel - Pelotas – RS  
24 – Brasil

25

27

28

## ABSTRACT

29

30 Equine semen storage and shipment, being it colled or frozen, allows the veterinarian

31 to direct matings, providing the use of genetically superior stallions, which are mostly

32 located in breeding stations or training centers. Achieving good pregnancy rates

33 depends, beyond the moment of artificial insemination (AI), on factors related to the

34 semen cooling, such as: system used for transport, cooling rate, final storage

35 temperature, storage time and individual variation among stallions, such as age and

36 resistance to cooling. Based on these aspects, this experiment was conducted in order

37 to test a polyethylene system to ship equine semen. A total of 87 ejaculates from five

38 stallions with known fertility were used. The stallions aged between 6-14 years old,

39 being three Thoroughbred and two Miniature Pony horse. The ejaculates were

40 collected twice a week using a Hannover artificial vagina. After each collection, the

41 semen sample was macroscopically evaluated for appearance, color and smell. A

42 semen sample was used to evaluate the parameters of total motility, vigor and

43 concentration, being these last three parameters assessed by counting 100 sperm cells

44 for analysis. These analysis were performed using an optical microscope, being the

45 concentration taken with a Neubauer chamber after dilution of 1:20 (semen: citrate

46 formol). Subsequently to this, the semen was diluted 1+1 (diluent+semen) with skim

47 UHT milk, Elegê<sup>®</sup> - Brasil, and divided into four aliquots of equal volume, yielding a

48 total of four groups. In the control group (CG) the semen was analyzed immediately

49 after dilution (zero hour - 0h). Samples from other groups were stored for eight hours

50 (8h) in three different devices: Equitainer<sup>®</sup> (EG), BotuFLEX<sup>®</sup> (BG) or Polyethylene

51 System – Cooled (PS) and non-Cooled (NPS). During storage of the samples the  
52 cooling curve of the system under study was evaluated, using a digital thermometer.  
53 To estimate the sperm viability, the parameters of total sperm motility and vigor were  
54 evaluated, the integrity of plasma membrane (PM) were evaluated using CFDA / PI,  
55 and the PM functionality using the hiposmotic test (HOST), being also examined the  
56 percentage of spermatozoa considered morphologically normal (sperm morphology).  
57 The PS showed a PM integrity and sperm morphology as the only parameters that did  
58 not occur a statistical difference when compared to Equitainer<sup>®</sup> and the BotuFLEX<sup>®</sup>  
59 (averages of the CFDA/PI = 71.12%, 73.29%, 71.32 and averages of morphology =  
60 80.50%, 82.29% and 81.28%, respective values of each parameter to PS, EG and BG),  
61 while NPS showed mean values lower than the GC and EG for all parameters  
62 (averages of total motility = 50.65% and 62, 60%; averages of vigor = 1.78 and 2.43;  
63 averages of CFDA/PI = 72.56% and 78.30%; averages of HOST = 43.56% and  
64 48.87%; averages of morphology = 77.17% and 84.82%, respectively for NPS and  
65 EG). Compared to BotuFLEX<sup>®</sup>, the NPS had no significant difference only for the  
66 parameter of PM functionality (HOST). The average temperature of PS was 18.0 °C,  
67 and the NPS was 18.2 °C. Based on the results we can conclude that the PS was equal  
68 or similar to the other used systems, but the NPS showed no difference when  
69 compared to PS. However NPS was worse than the other systems from this  
70 experiment. These results show that the PS might be an alternative to ship equine  
71 semen for eight hours, compared to the other cooled systems studied in this work.

72

73 Keywords: equine / cooled semen / passive cooling device

74

75

## INTRODUÇÃO

76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99

A inseminação artificial é a base para outras biotecnologias da reprodução em equinos [4]. Na espécie equina a refrigeração e o transporte de sêmen é a biotecnologia mais utilizada, [11], sendo que o transporte de sêmen refrigerado é rotineiramente utilizado na reprodução equina desde o final da década de 80 [9].

Apesar da melhora em termos de desempenho reprodutivo, através da aplicação de novas tecnologias e técnicas de manejo, alguns obstáculos ainda persistem na produção equina.

Atualmente existem diferentes metodologias e tipos de sistemas para o transporte de sêmen equino, porém alguns veterinários, ao transportar o sêmen por um trajeto curto, ainda insistem em colocar o mesmo em caixas de isopor, mantendo-o em contato direto com a fonte de resfriamento.

Analisando o atual mercado de sistemas refrigerados para o transporte de sêmen, este estudo teve como objetivo geral testar um sistema de Polietileno para o transporte de sêmen equino refrigerado por um período de até oito horas, tendo como objetivo específico o de comparar os valores encontrados neste sistema com outros dois sistemas já utilizados comercialmente.

## MATERIAL E MÉTODOS

100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123

### LOCAL E PERÍODO

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) em Porto Alegre, durante o período de Abril de 2012 a Novembro de 2013.

### ANIMAIS

Foram utilizados cinco garanhões saudáveis, com fertilidade comprovada, com idades entre 6 e 14 anos de idade, sendo três da raça Puro Sangue Inglês e dois da raça Pônei Miniatura Brasileiro. Todos os animais se encontravam em atividade sexual, com produção espermática estabilizada. O regime adotado foi de duas coletas semanais, realizadas em um intervalo de 48 horas uma da outra, resultando em um total de 87 ejaculados utilizados, sendo 64 deles para a avaliação do Sistema de Polietileno Refrigerado (SP) e 23 para o Sistema de Polietileno Não-Refrigerado (SPN).

Todos os animais se encontravam no mesmo local, e sujeitos às mesmas condições sanitárias e de manejo, mantidos em piquetes individuais, com pastagem nativa composta predominantemente por espécies de ciclo estival (gramíneas e leguminosas perenes), suplementados com alfafa e aveia branca em grãos duas vezes ao dia, com sal mineral e água *ad libitum*.

### COLETA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN

As coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial (VA) modelo Hannover, utilizando uma égua como manequim. A temperatura interna da VA esteve sempre entre +42 a +45°C. A fração gel foi removida com o auxílio de um filtro de *nylon* e o volume do ejaculado mensurado em proveta graduada.

124 Em seguida, a amostra de sêmen foi avaliada macroscopicamente quanto ao aspecto,  
125 coloração e odor, com o objetivo de se eliminar qualquer amostra que apresentasse alguma  
126 anormalidade – urospermia – sendo esta, quando presente, excluída do experimento. Uma  
127 amostra foi coletada e utilizada para avaliação dos parâmetros de motilidade, vigor e outra  
128 para concentração. Estas análises foram realizadas em microscópio óptico, sendo a  
129 concentração espermática realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer após diluição  
130 na proporção de 1:20 (sêmen : formol citrato). Posteriormente, o sêmen foi diluído na  
131 proporção de 1+1 (sêmen + diluente) com leite desnatado (Elegê®<sup>1</sup>). Foram analisadas as  
132 seguintes características (0h): motilidade total e vigor espermático através da microscopia  
133 óptica, integridade de membrana plasmática (CFDA/PI), funcionalidade de membrana  
134 plasmática (HOST) e morfologia espermática (% de espermatozoides normais), através da  
135 coloração de Cerovsky, sendo estes últimos três parâmetros avaliados através da contagem de  
136 100 células espermáticas por análise.

137 Em seguida, a amostra foi dividida em três alíquotas de 15 mL para armazenamento,  
138 as quais foram mantidas em três diferentes sistemas de armazenamento e transporte de sêmen  
139 por um período de oito horas: Equitainer II®<sup>2</sup>, BotuFLEX®<sup>3</sup> ou Sistema de Polietileno –  
140 Refrigerado (SP) e o Não Refrigerado (SPN). O BotuFLEX® foi sempre mantido a 5°C,  
141 utilizando um tubo Falcon com água em seu interior com o objetivo de perfazer o volume  
142 total de armazenamento, o mesmo sendo realizado também no Equitainer II®. Quanto à  
143 utilização dos diferentes Sistemas de Polietileno – SP e o SPN – o mesmo ocorreu de forma  
144 individualizada e distinta: algumas amostras foram armazenadas no SP, enquanto outras, de  
145 dias diferentes, armazenadas no SPN. No entanto, as duas formas de armazenamento foram  
146 realizadas dentro do mesmo período do ano, e de forma aleatória.

147 Transcorrido o período das oito horas de armazenamento, as amostras foram retiradas  
148 dos respectivos sistemas de refrigeração e colocadas em banho-maria à temperatura de 37°C,



149 e novamente avaliadas quanto aos parâmetros de motilidade total, vigor espermático,  
150 integridade e funcionalidade de membrana plasmática e morfologia espermática.

#### 151 CURVA DE RESFRIAMENTO SISTEMA DE POLIETILENO

152 A avaliação da curva de resfriamento foi realizada concomitantemente ao período de  
153 oito horas de armazenamento das alíquotas com termômetro digital. Os sistemas estudados  
154 foram mantidos em ambiente com temperatura controlada, sempre a 25°C, durante todo o  
155 período de armazenamento. O bulbo do termômetro foi mantido no interior do Sistema de  
156 Polietileno, evitando o contato do mesmo com a fonte de resfriamento, quando da presença  
157 desta. Um observador manteve-se na frente do visor por todo o período de avaliação,  
158 anotando cada oscilação de temperatura. Um total de quatro amostras foi utilizado para obter  
159 os dados de temperatura para cada um dos Sistemas de Polietileno estudados – Refrigerado e  
160 Não-Refrigerado, sendo a mensuração dos valores de temperatura feita de forma isolada, ou  
161 seja, um sistema de cada vez.

#### 162 ANÁLISE ESTATÍSTICA

163 A análise estatística foi realizada através da estatística descritiva ANOVA e a  
164 comparação de médias foi verificada utilizando *Least Significant Difference (LSD)* - diferença  
165 mínima significativa (DMS), com significância de 5%.

166

167

168

169

170

171

172

## RESULTADOS

Os valores médios de concentração e volume (livre de gel) dos ejaculados obtidos dos cinco ganhões utilizados neste experimento foram, respectivamente, de  $139,60 \pm 85,91$  ( $\times 10^6/\text{mL}$ ) e  $34,76 \pm 16,60$  (mL), conforme tabela apresentada em anexo (Anexo 1).

Quanto às médias dos demais parâmetros analisados neste estudo, obtidas no tempo de 0 (zero) hora, dos cinco ganhões utilizados, todas diferiram estatisticamente entre os ganhões, com exceção da morfologia espermática, como pode se observar no Anexo 2.

Nas tabelas 1 e 2, estão descritos os valores de motilidade total, vigor, CFDA/PI, HOST e morfologia espermática respectivamente para o SP e o SPN.

TABELA 1: Médias e valores de P para motilidade total (%), vigor espermático, CFDA/PI (%), HOST (%) e morfologia espermática (% de espermatozoides normais) observados no SP.

	SP	Equitainer	BotuFLEX
Motilidade Total	$45,00 \pm 2,47^a$	$49,29 \pm 2,60^a$	$46,40 \pm 2,60^a$
Vigor	$2,04 \pm 0,97^a$	$2,18 \pm 0,10^a$	$2,01 \pm 0,10^a$
CFDA/PI	$71,12 \pm 1,12^a$	$73,29 \pm 1,49^a$	$71,32 \pm 1,49^a$
HOST	$39,70 \pm 1,27^a$	$41,21 \pm 1,35^a$	$39,76 \pm 1,35^a$
Morfologia	$80,50 \pm 1,27^a$	$82,29 \pm 1,25^a$	$81,28 \pm 1,25^a$

Letras diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes ( $P < 0,005$ ).

190 TABELA 2: Médias e valores de P para motilidade total (%), vigor espermático, CFDA/PI  
 191 (%), HOST (%) e morfologia espermática (% de espermatozoides normais) observados no  
 192 SPN.

	SPN	Equitainer	BotuFLEX
Motilidade Total	50,65±4,11 <sup>b</sup>	62,60±2,57 <sup>a</sup>	61,52±2,57 <sup>a</sup>
Vigor	1,78±0,16 <sup>b</sup>	2,43±0,11 <sup>a</sup>	2,34±0,11 <sup>a</sup>
CFDA/PI	72,56±1,77 <sup>c</sup>	78,30±1,17 <sup>ab</sup>	77,73±1,17 <sup>b</sup>
HOST	43,56±2,11 <sup>b</sup>	48,87±1,70 <sup>a</sup>	47,30±1,70 <sup>ab</sup>
Morfologia	77,17±2,11 <sup>b</sup>	84,82±0,87 <sup>a</sup>	83,69±0,87 <sup>a</sup>

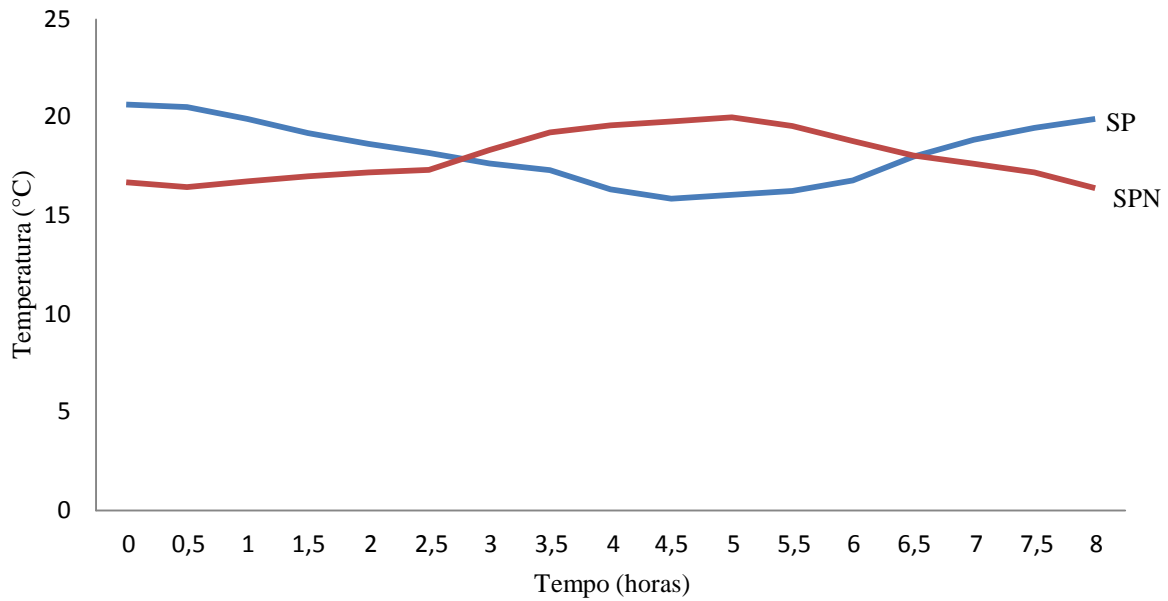
193 Letras diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes (P<0,005).

194

195 Conforme observado na tabela 1, para todos os parâmetros avaliados, não se observou  
 196 diferença entre o SP e os demais sistemas estudados.

197 Quanto à tabela 2, o SPN apresentou valores médios inferiores ao Equitainer<sup>®</sup> para  
 198 todos os parâmetros avaliados, exceto a morfologia espermática. Em comparação ao  
 199 BotuFLEX<sup>®</sup> o SPN apresentou valores médios inferiores para os parâmetros de motilidade  
 200 total, vigor espermático, integridade de membrana plasmática (CFDA/PI) e morfologia  
 201 espermática, não apresentando diferença estatística apenas para o parâmetro de funcionalidade  
 202 de membrana plasmática (HOST).

203 Já as curvas de resfriamento foram obtidas concomitantemente ao período de  
 204 armazenamento das alíquotas, sempre com os respectivos sistemas avaliados sob as mesmas  
 205 temperaturas externas, de 25°C, sendo as curvas do SP e do SPN expostas na figura 1. A  
 206 temperatura média do SP foi de 18,09°C, e para o SPN foi de 18,22°C.



207 .

208 Figura 1: Curva de refrigeração dos Sistemas de Polietileno Refrigerado (SP) e Não-  
 209 Refrigerado (SPN).

210

211

## DISCUSSÃO

212

213 A refrigeração do sêmen é uma biotécnica utilizada para aumentar a longevidade de  
 214 espermatozoides fora do trato reprodutivo, o que otimiza o seu uso e, por consequência,  
 215 aumenta o número de produtos obtidos de animais de genética superior [5]. O ciclo da  
 216 refrigeração inclui a redução da temperatura, o armazenamento e posterior reaquecimento do  
 217 sêmen para posteriormente ser utilizado [21], tendo como resultado esperado que a célula  
 218 espermática mantenha a sua integridade estrutural e função semelhante à célula espermática  
 219 do sêmen fresco [2].

220

221 Muitos fatores interferem na taxa de fertilidade do sêmen refrigerado, como por  
 222 exemplo, as diferenças individuais inerentes ao ganhão, o processamento do sêmen, o  
 diluente utilizado e a metodologia de refrigeração [3]. A capacidade de prever a fertilidade é

223 melhorada sempre que vários testes sejam utilizados em combinação, além de análises de  
224 múltiplas amostras [20].

225 Sendo assim, este trabalho utilizou como parâmetros buscando prever a viabilidade  
226 do sêmen armazenado a Motilidade Total, o Vigor Espermático, a Integridade e  
227 Funcionalidade da Membrana Plasmática, além da Morfologia Espermática. A fertilidade no  
228 garanhão tem sido associada com a morfologia e a motilidade espermática [12], apesar de que  
229 testes de fertilização *in vitro* não foram correlacionados com a motilidade [19].

230 No presente estudo, a motilidade total e o vigor espermático foram realizados  
231 concomitantemente, através da microscopia óptica. Este método permite determinar, de forma  
232 subjetiva, uma estimativa da porcentagem de espermatozoides com movimento em um  
233 ejaculado [6], bem como o vigor destes movimentos [14]. Segundo Pickett [17], a motilidade  
234 espermática é um dos principais métodos de avaliação de espermatozoides, sendo ela um  
235 indicador da qualidade da célula espermática e um componente de rotina no exame  
236 andrológico do garanhão [7].

237 A motilidade total e o vigor apresentados pelo SP não apresentaram diferença quando  
238 comparado ao Equitainer<sup>®</sup> e ao BotuFLEX<sup>®</sup>. Ao se avaliar a motilidade total e o vigor  
239 espermático apresentado pelo SPN, o mesmo apresentou valores médios inferiores aos demais  
240 tratamentos utilizados.

241 Ainda, esta diminuição da motilidade ocorrida no SPN em comparação aos  
242 tratamentos estudados neste trabalho (Equitainer<sup>®</sup> e o BotuFLEX<sup>®</sup>) pode ser explicada  
243 também em termos de mudanças no transporte ativo e permeabilidade da membrana  
244 plasmática [21]. Segundo MORAN et al.[15], quando este armazenamento ocorre por  
245 períodos mais longos, a motilidade total diminui.

246 Apesar desta igualdade apresentada para o parâmetro de motilidade total entre o SP, o  
247 Equitainer<sup>®</sup> e o BotuFLEX<sup>®</sup>, seus valores médios foram inferiores à motilidade total

248 reportada pelo CBRA [6] para sêmen refrigerado ( $\geq 50\%$ ). O contrário se observou com os  
249 valores médios da motilidade total observada no SPN, no Equitainer<sup>®</sup> e no BotuFLEX<sup>®</sup>.  
250 Apesar de a motilidade total do SPN (50,65%) apresentar diferença em relação a motilidade  
251 total do Equitainer<sup>®</sup> e BotuFLEX<sup>®</sup> (62,60% e 61,52%, respectivamente), estes valores se  
252 apresentaram superiores ao reportado pelo CBRA [6].

253 Segundo AURICH [2], o processamento do sêmen danifica a membrana plasmática do  
254 espermatozoide e provoca uma perda da motilidade, o que se evidenciou na motilidade total  
255 do presente estudo, tendo como reflexo a diminuição da motilidade total dos tratamentos em  
256 comparação ao sêmen avaliado na 0 hora.

257 No presente estudo, a integridade de membrana foi avaliada através da utilização de  
258 duas colorações fluorescentes: CFDA e PI. Segundo Harrison & Vickers [8], a utilização  
259 conjunta do CFDA com o PI é a forma mais segura para se avaliar a integridade de membrana  
260 do que a utilização isolada destes corantes.

261 Amann & Pickett [1] e Moran et al. [15] relataram a ocorrência de danos na membrana  
262 espermática devido ao processo de refrigeração, o que não foi evidenciado no presente estudo,  
263 quando da utilização do SP, o qual não apresentou diferença para o parâmetro de integridade  
264 de membrana plasmática quando comparado com os demais tratamentos.

265 Quanto à funcionalidade de membrana plasmática, comparando os valores encontrados  
266 pelo SP e SPN com os demais sistemas refrigerados estudados, o SP não diferiu do  
267 Equitainer<sup>®</sup> nem do BotuFLEX<sup>®</sup>, sendo que o SPN não diferiu do BotuFLEX<sup>®</sup>, porém diferiu  
268 do Equitainer<sup>®</sup>.

269 Para se avaliar a funcionalidade de membrana, o Teste Hiposmótico (HOST) foi o de  
270 eleição para nossas avaliações. O HOST foi inicialmente utilizado para avaliar a função da  
271 membrana plasmática e a capacidade de fertilização do espermatozoide humano, no entanto,  
272 soluções hiposmóticas também têm sido utilizadas para avaliar o espermatozoide equino [16].

273 A porcentagem de espermatozoides normais do SP não diferiu do Equitainer<sup>®</sup> nem do  
274 BotuFLEX<sup>®</sup>, já no SPN foi inferior aos demais tratamentos. Apesar das diferenças estatísticas  
275 encontradas entre o SPN e os demais tratamentos para a porcentagem de espermatozoides  
276 normais, tanto o SPN quanto o SP apresentaram valores mínimos para este parâmetro de  
277 acordo com o que cita a literatura [6]. Corroborando com o encontrado neste trabalho para o  
278 SP, Samper & Morris [18] reportaram que o tempo de refrigeração não interferiu nas  
279 alterações morfológicas.

280 Love [13] avaliou a fertilidade de 88 garanhões de 13 diferentes raças, onde observou  
281 uma relação positiva entre a porcentagem de espermatozoides normais com a porcentagem de  
282 prenhez por ciclo e a porcentagem de prenhez no primeiro ciclo.

283 As altas médias de temperatura do SP (18,09°C) e do SPN (18,22°C) podem ter sido  
284 um fator crucial na não manutenção de algumas características espermáticas estudadas neste  
285 trabalho. Porém, Katila [10] relata que, para o transporte do sêmen por um período não  
286 superior a 12 horas, a temperatura de armazenamento do sêmen pode ser entre 20 e 15°C,  
287 sendo recomendadas temperaturas inferiores a 10°C para períodos de transporte superiores a  
288 estas 12 horas.

289 Estudos *in vivo* não foram realizados neste trabalho, porém os resultados apresentados  
290 permitem dizer que o SP não causou danos à célula espermática que comprometessem sua  
291 integridade de membrana plasmática, dados os valores médios obtidos no presente trabalho  
292 quanto aos parâmetros de integridade de membrana plasmática e morfologia espermática.

293

294

295

296

297

## CONCLUSÃO

298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322

O Sistema de Polietileno Refrigerado pode ser utilizado para a conservação do sêmen, uma vez que não acarretou danos ao sêmen equino durante o período de armazenamento estudado. O Sistema de Polietileno Refrigerado não apresentou diferenças em relação aos demais sistemas comerciais estudados, sendo assim, este pode ser indicado como um sistema alternativo para transporte de sêmen equino refrigerado por até oito horas, com vantagem de ser pequeno, prático e de baixo custo.

## SOURCES AND MANUFACTURERS

1. Leite Longa Vida UHT Desnatado ELEGÊ® - 1L; BR Foods S.A.; Brasil
2. Equitainer®; Hamilton Research, Inc.; U.S.A.
3. BotuFLEX®; Botupharma; Botucatu, Brasil.
4. Sistema de Polietileno; Thermics®; Uruguai.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 323
- 324
- 325 1 Amann R.P. & Pickett B.W. 1987. Principles of cryopreservation and a review of  
326 cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*. 7: 145-173.
- 327 2 Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored  
328 stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 89 (1-4): 65-75.
- 329 3 Aurich C. 2008. Recent advantages in cooled-semen technology. *Animal Reproduction*  
330 *Science*. 107 (3-4): 268-275.
- 331 4 Aurich J.E. 2012. Artificial Insemination in Horses – More than a century of practice  
332 and research. *Journal of Equine Veterinary Science*. 32: 458 – 463.
- 333 5 Brinsko S., Varner D. & Blanchard T. 2000. Transported Equine Semen. In: Ball B.A.  
334 (Ed). *International Veterinary Information Service (OVIS)*. New York: Recent Advances in  
335 Equine Reproduction, pp.207-400.
- 336 6 CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013. *Manual para exame*  
337 *andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: CBRA, 3: 91 p.
- 338 7 Foster M.L., Varner D.D., Hinrichs K., Teague S., Lacaze K, & Blanchard T.L. 2011.  
339 Agreement between measures of total motility and membrane integrity in stallion sperm.  
340 *Theriogenology*. 75 (8): 1499-1505
- 341 8 Harrison R.A.P. & Vickers S.E. 1990. Use of fluorescent probe to assess membrane  
342 integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. 88: 343-352.
- 343 9 Heckenbichler S., Deichsel K., Peters P. & Aurich C. 2011. Quality and fertility of  
344 cooled-shipped stallion sêmen at the time of insemination. *Theriogenology*. 75: 849 – 856.

- 345 10 Katila T., Combes G.B., Varner D.D. & Blanchard T.L. 1997. Comparison of three  
346 containers used for the transport of cooled stallion semen. *Theriogenology*, 48: 1085-1092.
- 347 11 Loomis P. R. 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion  
348 Semen. *Veterinary Clinics North American Equine Practice*. 22(3): 663-676.
- 349 12 Love C.C. & Kenney R.M. 1998. The relationship of increased susceptibility of sperm  
350 DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*. 50: 955-972.
- 351 13 Love C. C. 2011. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of  
352 stallions. *Theriogenology*. 76: 547-557.
- 353 14 Mies Filho, A. 1975. *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. Porto Alegre:  
354 Livraria Sulina editora, 4: 463-513.
- 355 15 Moran D.M., Jasko D.J, Squires E.L. & Amann R.P. 1992. Determination of  
356 temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa.  
357 *Theriogenology*. 38: 999-1012.
- 358 16 Nie, G.J. & Wensel J.G.W. 2001. Adaptation of hipoosmotic swelling test to assess  
359 functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, 55:1005-  
360 1018.
- 361 17 Pickett, B.W. 1993. Seminal extenders and cooled semen. In: Mckinnon A.O. &  
362 VOSS J.L. *Equine Reproduction*. 2.ed. Filadélfia: Lea &Febiger, p. 746-754.
- 363 18 Samper J.C. & Morris C.A. 1998. Current methods for stallion semen  
364 cryopreservation: a survey. *Theriogenology*. 49 (3): 895-903.
- 365 19 Tartaglione C.M. & Ritta M.N. 2004. Prognostic value of spermatological parameters  
366 as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 62: 1245-1252.

367 20 Varner D.D. 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*. 70  
368 (3): 448-462.

369 21 Watson P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of  
370 spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and*  
371 *Development*. 7: 871-891.

372

#### 373 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

374

- 375 • Quanto ao Sistema de Polietileno Refrigerado, é indicado seu uso para o transporte  
376 de sêmen refrigerado por 8 horas, quando comparado aos demais sistemas de  
377 refrigeração estudados neste trabalho.
- 378 • Quanto ao Sistema de Polietileno Não-Refrigerado, não é indicado seu uso para o  
379 transporte de sêmen refrigerado por 8 horas, quando comparado aos demais sistemas  
380 de refrigeração estudados neste trabalho.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAS, A.P.; PINTO, da S.P. Regionalization of transmembrane glycoproteins in the plasma membrane of boar sperm head is revealed by fracture-label. **The Journal of Cell Biology**, v. 97, p. 1356-1364, 1983.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science Wildomar-California**, v.7, n.3, p. 145-173, 1987.

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v.10, p. 89-95, 1989.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. Em: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Filadélfia: Lea &Febiger, p. 715-745, 1993.

AMANN, R.P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potencial developments. **Theriogenology**. v. 81, p. 5-17, 2014.

AURICH C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v. 89 n. 1-4, p. 65-75, 2005.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, p. 268-275, 2008.

AURICH, J.E. Artificial Inseminationin Horses – More than a century of practice and research. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 32, p. 458 – 463, 2012.

AVANZI, B.R.; FARRÁS, M.C.; MELO, C.M.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA, J.A.; MEDEIROS, A.S.L.; ARAÚJO, G.H.M.; PAPA, F.O.. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment. **Animal Reproduction Science**, v. 94 p. 152–154, 2006.

BATELLIER, F.; MAGISTRINI, M. INRA96<sup>®</sup>: an efficient extender to freeze stallion semen. **Joint Research Unit for Reproductive and Behavioural Physiology**, 2009. Disponível em: <<http://www.inra.fr/en/Partners-and-Agribusiness/Results-Innovations-Transfer/All-the-news/INRA96-R>>. Acesso em: 22/Jul./2014.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.

BAUMBER-SKAIFE, J. From a Sperm's Eye View: Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; **Equine Reproduction**. Ed. 2. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., Cap. 124, p. 1278 – 1291, 2011.

BEDFORD-GUAUS, S. J. Transported stallion semen and breeding mares with cooled or frozen-thawed semen. **Clinical Techniques in Equine Practice**. v. 6, p. 239-248, 2007.

BIELANSKI, W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use of normal fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**. Cambridge Suppl. 23, p. 19-24, 1975.

BIELANSKI, W.; KACZMARSKI, F. Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**. Suppl.27, p. 39-45, 1979.

BIELANSKI, W.; DUDEK, E.; BITTMAR, A.; KOSINIAK, K. Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. Suppl. 32, p. 21-26, 1982.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; HURTGEN, J.P.; CUMMINGS, M.R.; KENNEY, R.M. Use of a semen extender containing antibiotic to improve the fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to Pseudomonasaeruginosa. **Theriogenology**, v.28, n. 4, p. 541-546, 1987.

BRINKLEY, W.B.R. Microtubules: a brief historical perspective. **Journal of Structural Biology**. v. 118, p. 84-86, 1997.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination and preservation of semen. In: BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Stallion Management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 8, n. 1, p. 205-218, 1992.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 790-797, 1992b.

BRINSKO, S.P.; ROWAN, K.R.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1641-1655, 2000.

BRINSKO, S.; VARNER D.; BLANCHARD T. Transporte de sêmen equino. **Department of Large Animal Medicine and Surgery**. Texas: Texas A&M. 2000.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R.; SILVA, L.D.M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**.v.29, n.3/4, p.179-187, 2005.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBNIS, E.Z. Validation of an acrossomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**. v. 14, n. 4, 1993.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3 ed., Belo Horizonte: CBRA, 91 p., 2013.

CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura de cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

CHALAH, T.; BRILLARD, J.P. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescent (SYBR-14/PI). **Theriogenology**. v. 50, p. 487-493, 1998.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA. Estudo do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil. Brasília: CNA, 2006.

CRESPILHO, A.M.; SPIZZIRI, B.E.; MEYERS, M.; GRAHAM, J.K. The effect of cholesterol addition, buffer, and ph on equine sperm stored at 5°C. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.33, p. 663-666, 2013.

DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O., ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A.; LEONARDO, H. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v 26, p.189-191, 2002.

DOTT, D.M. Morphology of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science** Suppl. 23, p. 41-46, 1975.

EDDY, E.M. The Spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. Cap. 1, v. 1, ed. 3, p. 3-38. Elsevier Inc., 2006. Disponível em: [http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=1\\_1cDe92k\\_YC&oi=fnd&pg=PA3&dq=EDDY,+E.M.%3B+O%27BRIEN,+D.A.&ots=DS3zpCjPxj&sig=OpzVAUOMIfmsDszfLP4OwOmqlzo#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=1_1cDe92k_YC&oi=fnd&pg=PA3&dq=EDDY,+E.M.%3B+O%27BRIEN,+D.A.&ots=DS3zpCjPxj&sig=OpzVAUOMIfmsDszfLP4OwOmqlzo#v=onepage&q&f=false). Acesso em: 15/Nov./2013.

EDELMAN, G.M.; MILETTE, C.F. Molecular probes of spermatozoa structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 68, n. 10, p. 2436-2440, 1971.

FARRÁS, M.C.; AVANZI, B.R.; MELO, C.M.; DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.693-699, 2008.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FLORES-RODRIGUEZ, S.A.; ARRUDA, R.P.; BIANCHI-ALVES, M.R.; AFFONSO, F.J.; LANÇONI, R.; CARVALHO, H.F.; LEMES, K.M.; de ANDRADE, A.F.C.; CELEGHINI, E.C.C. Morphofunctional characterization of cooled sperm using different extenders in equine-assisted reproduction. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.34, p. 94, 2014.

FOSTER, M.L.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; BRINSKO, S.P.; HINRICHS, K.; TEAGUE, S.; LACAZE, K.; BLANCHARD, T.L. Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. **Theriogenology**. v.76, p. 334-341, 2011.

GARNER, D.L. Hoechst 33342: The dye that enable differentiation of living X- and Y-chromosome bearing mammalian sperm. **Theriogenology**. v. 71, p. 11-21, 2009.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; YUE, S.T.; ROTH, B.L.; HAUGLAND, R.P. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. **Journal of Andrology**. v. 15, n. 6, 1994.

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**. v. 34; p. 127-138; 1986.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**. v.43, p. 55-64, 1990.

GUERRA, P.; MEDEIROS, S.A.F. O agronegócio da equideocultura no Brasil: Em: **I Simpósio mineiro de equideocultura**, Viçosa, MG. Anais, p.188, 2007.

HAFEZ, E.S.E. Avaliação de sêmen. Em: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6. ed. São Paulo: Editora Monole Ltda, p. 411-429, 1995.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed., São Paulo: Manole, 530p., 2003.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, n.1, v. 11, p. 73-88, 1990.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probe to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **J. Reprod. Fert.** v. 88, p. 343-352, 1990.

HECKENBICHLER, S.; DEICHSEL, K.; PETERS, P.; AURICH, C. Quality and fertility of cooled-shipped stallion sêmen at the time of insemination. **Theriogenology**. v. 75, p. 849 – 856, 2011.

JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35, p. 1059-1067, 1991.

JASKO, D.J.; SMITH, K.; LITTLE, T.V.; LEIN, D.; FOOTE, R.H. A spectrophotometric procedure for determination of objective measurements of equine spermatozoan motility. **Theriogenology**. v. 31, n. 5, 1989.

JEYENDRAN, R.S.; VANDERVENTS, H.H.; PELAEZ, M.P.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other sêmen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 70, p. 219-228, 1984.



JOHNSON, L.A.; MAXUEL, W.M.C.; BRISKY, J.R. Staining sperm or viability assessment. **Reproduction in Domestic Animals.**, v.31, n.1, p.37-45, 1996.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, n. 7, p. 1217-1227, 1997.

KATILA, T.; COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 1085-1092. 1997.

KAYSER, J. P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K.; SQUIRES, E.L.; JASKO, D.J.; PICKETT, B.W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, n. 4, p. 601-614, 1992.

KELLER, A. Efeito de dois métodos de remoção do plasma seminal, de três diluentes e do tempo de armazenamento sobre algumas características espermáticas dos equinos, **Dissertação, Porto Alegre/RS**, 1998.

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

KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.P.; PIERSON, R.; WITHERSPOON, D.; SIMMONS, J. **Manual for Clinical Fertility Evaluation of the stallion**. Society for Theriogenology. p. 97, 1983.

LAGARES, M.A.; MEIRELES, L.S.; WALD, V.B.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Efeito de diferentes diluidores sobre a membrana plasmática do espermatozoide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v.7, n.3, p. 153-156, 2000.

LEFRAPPER, M.S.; WALSTON, B.S.; WHISNANT, C.S. Comparison of various extenders for storage of cooled stallion spermatozoa for 72 hours. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.30, n.4, p. 200- 204, 2010.

- LIMA, R.A.S.; SHIROTA R.; BARROS G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. **Centro de estudos avançados em economia aplicada, CEPEA/ESALQ/USP**. Piracicaba, 2006.
- LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Sêmen. **Veterinary Clinics North American Equine Practice**, v. 22, n. 3, p. 663-676, 2006.
- LOVE, C.C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**. v. 76, p. 547-557, 2011.
- LOVE, C. C. Measurement of Concentration and Viability in Stallion Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**. 32; 8: 464-466, 2012.
- LOVE, C.C.; KENNEY, R.M. The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. **Theriogenology**. v.50, p. 955-972, 1998.
- MAGISTRINI, M. Semen Evaluation. Em: SAMPER, J.C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, cap. 08, 2000.
- MALMGREN, L. Assessing the quality of raw semen: A review. **Theriogenology**, v.48, p.523-530, 1997.
- MALMGREN, L. Effectiveness of two systems for transporting equine semen. **Theriogenology**, v.50, p. 833-839, 1998.
- MAXWELL, W.M.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**. v. 8, p. 1165-1178, 1996.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de semen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 71-78, 1999.
- MEYERS, S.A. Sperm Physiology. Em: SAMPER, J.C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 2nd. Ed. Missouri: Saunders Elsevier, cap. 05, p. 47-55, 2009.
- MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 4.ed. Porto Alegre: Livraria Sulina editora, p. 463-513, 1975.
- MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, p. 2372-2381, 2005.

MORAN, D. M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P.. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, n. 6, p. 999-1012, 1992.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, n.5, p.403-439, 1997.

NIE, G.J.; WENSEL, J.G.W. Adaptation of hipoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, v.55, p. 1005-1018, 2001.

PALHARES, M. S. **Adequação de um novo container para o transporte do sêmen equino diluído e resfriado**: I - características Termodinâmicas e funcionais, II – desempenho reprodutivo das éguas inseminadas. 1997. 246 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Escola de Veterinária. Belo Horizonte, 1997.

PAPA, F.O.; MELO, C.M.; DELL'AQUA, J.A.; MACEDO, L.P. CARVALHO, A.G.; ALVARENGA, M.A.; MEDEIROS, A.S.L. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p. 19-27, 2005. Suppl. 1.

PETERSON, R.N.; SILVERSTEINS, K. FREUND, M. A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 41, p. 485-488, 1974.

PICKETT, B.W. Seminal extenders and cooled semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Filadélfia: Lea &Febiger, p. 746-754., 1993.

PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; SEIDEL, G.E.; BERNDTSON, W.E.; VOSS, J.L. Reproductive physiology of the stallion. VI. Seminal and behavioral characteristics. **Journal of Animal Science**. 43: 617–625, 1976.

PILLET, E.; BATELLIER, F.; DUCHAMP, G.; FURSTOSS, V.; LE VERN, Y.; KERBOEUF, D.; VIDAMENT, M.; MAGISTRINI, M. Freezing stallion semen in INRA96<sup>®</sup> - based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. **Dairy Sci. Technol.**, v.88, p.257-265, 2008.

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

RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide eqüino refrigerado**. 2007. 111 f. São Paulo. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ROTA, A.; FURZI, C.; PANZANI,D.; CAMILO,F. Studies on motility and fertility of cooled stallion spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 39, p. 103-109, 2004.

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

SAMPER, J.C.; MORRIS, C.A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**. v. 49, n.3, p. 895-903, 1998.

SILVA FILHO, J. M. **Aspects of the reproductive handling and of the semen in the artificial insemination in mares**. Tese de Doutorado – Departamento de Ciência Animal Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 402 f., 1994.

SINGER, S. J., NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p.720-31, 1972.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. Fort Collins: animal reproduction biotechnology laboratory. **Colorado State University**, Bulletin n. 9, 1999.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**. V.62, p. 1245-1252, 2004.

TEIXEIRA, A.L. Cavalo Crioulo: o símbolo do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Viver no Campo, 2.ed., 248 p., 2011.

TERRACIANO, P.B. **Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Medicina Veterinária, UFRGS, 2008.

VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J.M.; PALHARES, M.S.; MELO, M.A.; MAGNANO, L.G.P. Utilização de um contêiner modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 51, n. 5, p. 505-514, 1999.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoa motility parameters. **Theriogenology**, v.28, p. 709-723, 1987.

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

VARNER, D.D. et al. Breeding soundness examination IN: VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L. Dises and management of the breeding stallions. Goleta – Califórnia: **American Veterinary Public.** p. 97-116, 1991.

VARNER, D.D. Developments in stallion sêmen evaluation. **Theriogenology**, v. 70, p. 448-462, 2008.

VARNER, D.D.; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View: Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; **Equine Reproduction.** Ed. 2. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., Cap. 98, p. 909 – 990, 2011.

VARNER, D.D., VAUGHAN, S.D., JOHNSON, L. Use of computerized system for evaluation of equine spermatozoal motility. **American Journal Of Veterinary Research.** v. 52, n. 2, p. 224-230, 1991.

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility.** v. 62, p. 483-492, 1981.

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

WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S.; JONES, R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.59, p. 1506-1514, 1998.

## ANEXOS

ANEXO 1 - Valores médios de concentração espermática e volume do ejaculado dos garanhões.

Garanhão	Concentração Espermática ( $\times 10^6$ / mL)	Volume (mL)
1	126,80 $\pm$ 26,41	56,00 $\pm$ 6,90
2	241, 61 $\pm$ 13,92	31,77 $\pm$ 3,64
3	154, 89 $\pm$ 19,69	24,00 $\pm$ 5,15
4	109,55 $\pm$ 10,61	31,67 $\pm$ 2,77
5	73,92 $\pm$ 12,06	34,79 $\pm$ 3,15
P	>0,0000	0,0030



ANEXO 2 – Médias e valores de P para o sêmen diluído, no tempo 0 hora para motilidade total (%), vigor espermático, CFDA/PI (%), HOST (%) e morfologia (% de espermatozoides normais) dos garanhões utilizados.

Garanhão	Motilidade Total	Vigor	CFDA/PI	HOST	Morfologia
1	41,60±3,45 <sup>b</sup>	2,08±0,13 <sup>b</sup>	66,80±2,09 <sup>c</sup>	46,55±2,35 <sup>a</sup>	84,40±2,02 <sup>a</sup>
2	44,22±1,82 <sup>b</sup>	1,68±0,07 <sup>c</sup>	69,42±1,17 <sup>c</sup>	44,06±1,24 <sup>a</sup>	81,72±1,06 <sup>a</sup>
3	70,00±2,57 <sup>a</sup>	2,73±0,10 <sup>a</sup>	81,88±1,56 <sup>a</sup>	45,83±1,75 <sup>a</sup>	83,88±1,50 <sup>a</sup>
4	69,77±1,39 <sup>a</sup>	2,62±0,05 <sup>a</sup>	78,04±0,87 <sup>b</sup>	43,74±0,94 <sup>a</sup>	81,58±0,81 <sup>a</sup>
5	47,16±1,58 <sup>b</sup>	1,98±0,06 <sup>b</sup>	70,83±0,99 <sup>c</sup>	39,78±1,07 <sup>b</sup>	81,35±0,92 <sup>a</sup>
P	>0,0000	>0,0000	>0,0000	0,0049	0,4362

Letras diferentes na mesma coluna indicam valores estatisticamente diferentes (P<0,005).