

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS SEMINAIS PÓS-DESCONGELAMENTO EM GARANHÕES
DA RAÇA CRIOLA**

LEONARDO GLAESER PAUL

**PORTO ALEGRE
2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS SEMINAIS PÓS-DESCONGELAMENTO EM
GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA**

AUTOR: LEONARDO GLAESER PAUL

**Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Veterinária como requisito
parcial para obtenção de Graduação em
Medicina Veterinária**

ORIENTADOR: RODRIGO COSTA MATTOS

CO-ORIENTADOR: HENRIQUE BOLL DE ARAUJO BASTOS

PORTO ALEGRE

2019

RESUMO

O uso da inseminação artificial com sêmen congelado, além de possibilitar a conservação e utilização do material genético de reprodutores por tempo indeterminado, favorece a sua difusão, oportunizando a maximização do potencial genético de garanhões zootecnicamente superiores. Este trabalho teve como objetivo avaliar as características seminais de garanhões da raça Crioula após o processo de criopreservação. Foram utilizados ejaculados de 24 garanhões da raça Crioula, localizados próximo a Porto Alegre (30°S, 51°W), RS, Brasil. As análises microscópicas foram realizadas pré e pós-congelamento através do sistema Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision®. Foi realizada a concentração espermática, a análise da integridade física da membrana e a funcionalidade da membrana plasmática (HOST). Somente foram utilizadas amostras com motilidade total $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 . Todas as amostras foram submetidas ao processo de criopreservação. Valores médios e desvios padrão das variáveis do sêmen fresco: Concentração (250×10^6 milhões/ml $\pm 135,34$); Teste Hiposmótico (HOST) ($63,09\% \pm 14,02$); Fluorescência ($63,04\% \pm 10,45$); Motilidade Total (MT) ($75,93\% \pm 10,27$); Motilidade Progressiva (MP) ($53,71\% \pm 18,38$); Motilidade Rápida (MR) ($13,78\% \pm 10,38$); Motilidade Lenta (ML) ($32,43\% \pm 13,37$); Motilidade Local (MC) ($22,43\% \pm 10,17$); Imóveis (IM) ($23,24\% \pm 10,89$); Velocidade Curvilínea (VCL) ($116,88\mu\text{m/s} \pm 42,34$); Velocidade em Linha Reta (VSL) ($44,79\mu\text{m/s} \pm 17,72$); Velocidade Média da Trajetória (VAP) ($56,40\mu\text{m/s} \pm 21,08$). Valores médios e desvios padrão das variáveis pós-congelamento: HOST ($42,73\% \pm 7,06$); Fluorescência ($48,06\% \pm 8,99$); MT ($52,85\% \pm 7,27$); MP ($31,15\% \pm 10,21$); MR ($4,78\% \pm 5,37$); ML ($24,89\% \pm 8,17$); MC ($22,44\% \pm 8,68$); IM ($45,04\% \pm 8,86$); VCL ($97,67\mu\text{m/s} \pm 35,25$); VSL ($35,33\mu\text{m/s} \pm 15,29$); VAP ($44,99\mu\text{m/s} \pm 17,98$). O sucesso da criopreservação dependente de uma série complexa de interações, envolvendo fatores intrínsecos do garanhão, constituição da membrana do espermatozoide, natureza do diluente e taxas de variação de temperatura durante o protocolo. Concluímos que o protocolo utilizado para a criopreservação é viável para utilização no sêmen de cavalos da raça Crioula, seguindo a recomendação mínima dos parâmetros seminais pós-congelamento do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

Palavras chaves: criopreservação, sêmen, espermatozoides, fertilidade, equino.

ABSTRACT

Artificial insemination with froze semen, allows the conservation and utilization of genetic material of breeders for an indefinite period, and favors the diffusion, allowing the maximization of the genetic potential of zootechnically superior stallions. The aim of this study was evaluation of ejaculates of Crioulo breed, placed near to Porto Alegre, RS, Brazil. Were used ejaculates of 24 stallions of the Crioulo breed, located near Porto Alegre, RS, Brazil. Microscopic analyzes were performed pre and post-freezing through the Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision® system. Sperm concentration, membrane integrity and plasma membrane functionality (HOST) were performed. Only samples with total motility $\geq 60\%$ and vigor ≥ 3 were used. All samples were submitted to the cryopreservation process. Mean values and standard deviations of fresh semen variables: Concentration (250 x 106 million / ml $\pm 135,34$); HOST (63.09% ± 14.02); Fluorescence (63.04% ± 10.45); Total Motility (MT) (75.93% ± 10.27); Progressive Motility (MP) (53.71% ± 18.38); Rapid Motility (MR) (13.78% ± 10.38); Slow Motility (ML) (32.43% ± 13.37); Local Motility (MC) (22.43% ± 10.17); Immotile (IM) (23.24% ± 10.89); VCL (116.88 μm / s ± 42.34); VSL (44.79 μm / s ± 17.72); VAP (56.40 μm / s ± 21.08). Mean values and standard deviations of post-freeze variables: HOST (42.73% ± 7.06); Fluorescence (48.06% ± 8.99); MT (52.85% ± 7.27); MP (31.15% ± 10.21); MR (4.78% ± 5.37); ML (24.89% ± 8.17); MC (22.44% ± 8.68); IM (45.04% ± 8.86); VCL (97.67 μm / s ± 35.25); VSL (35.33 μm / s ± 15.29); VAP (44.99 μm / s ± 17.98). The success of cryopreservation depends on a complex series of interactions, involving intrinsic factors of the stallion, constitution of the sperm membrane, nature of the diluent and final temperature of storage. We conclude that the protocol used for cryopreservation is viable for use in the semen of Crioulo breed, following the minimum recommendation of the post-freezing semen parameters of the Brazilian College of Animal Reproduction.

Keywords: cryopreservation, sperm, fertility, equine.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, pelo apoio incondicional que possibilitou percorrer a jornada da graduação. Aos meus pais em especial, que nunca mediram esforços para me incentivar na busca dos meus sonhos e objetivos. Aos meus irmãos por todo apoio. À minha mãe que deve estar muito feliz e contente com as minhas conquistas.

À minha namorada, Gabriella Velho, que a faculdade proporcionou conhecer, por todo carinho e companheirismo nos momentos difíceis.

Aos meus amigos da faculdade Rogan Kummer, Giovani Camozzato, Henrique Bastos, Gabriel Oliveira, Verônica Bueno, Matheus Fagundes, Dominique Wenzen, Anna Bettina, Vinicius Camargo, Marcos Schiavoni, Carlos Vier e todos outros que foram muito importantes em todos os momentos, em especial nos assados do Reprolab.

Ao meu professor orientador, Rodrigo Costa Mattos, por todos os ensinamentos científicos e pessoais.

Ao Laboratório de Reprodução Animal - REPROLAB - e seus integrantes, por proporcionar todos os recursos necessários para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Tormenta do Recanto do Boqueirão e à Gazela do Pahecan que foram as responsáveis pelo meu grande afeto para com os cavalos.

À minha cadela, Guria, pelo companheirismo e amizade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal do garanhão.....	13
Figura 2	Diagrama de um espermatozoide equino.....	15
Figura 3	Desenho de uma seção de um túbulo seminífero garanhão mostrando a relação das células germinativas e células de Sertoli adjacentes no epitélio seminífero.....	17
Figura 4	Estrutura geral da membrana plasmática.....	19
Figura 5	Estrutura de membrana em estado fluido (37°C) e em estado gel (5°C), demonstrando o efeito do colesterol na interação entre lipídios.....	20
Figura 6	Representação de uma solução congelada.....	22
Figura 7	Mecanismo de proteção espermática pelo leite e gema de ovo.....	27
Figura 8	Médias (% \pm DP) dos resultados da análise de cinética espermática através do sistema CASA.....	34
Figura 9	Médias (% \pm DP) dos resultados da análise de cinética espermática através do sistema CASA.....	34
Figura 10	Médias ($\mu\text{m/s} \pm$ DP) dos resultados da análise de cinética espermática através do sistema CASA. Velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média da trajetória (VAP).....	35
Figura 11	Médias ($\mu\text{m/s} \pm$ DP) dos resultados da análise de cinética espermática através do sistema CASA. Linearidade (LIN), frequência de batimento do flagelo (BCF), deslocamento lateral da cabeça (ALH).....	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1	Endocrinologia Reprodutiva do Garanhão.....	10
2.1.1	Prolactina, Hormônios da Tireóide, Hormônios do Crescimento e Opióides.....	11
2.2	Espermatozoide.....	13
2.3	Espermatogênese.....	15
2.4	Resfriamento de Sêmen.....	17
2.5	Congelamento de Sêmen.....	21
2.6	Diluentes de Sêmen.....	24
2.7	Crioprotetor.....	25
2.8	Plasma Seminal.....	27
3	ARTIGO.....	29
3.1	Resumo.....	29
3.2	Abstract.....	30
3.3	Introdução.....	31
3.4	Materiais e Métodos.....	32
3.5	Resultados.....	33
3.6	Discussão.....	36
3.7	Conclusão.....	37
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39
	APÊNDICE A - Resumo publicado CBRA.....	46
	ANEXO A - Convite para publicação.....	47

2019/01

Leonardo Glaeser Paul

**CARACTERÍSTICAS SEMINAIS PÓS-DESCONGELAMENTO EM
GARANHÕES DA RAÇA CRIOLA**

Aprovado em 04 de julho de 2019

APROVADO POR:

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

Orientador

Dr. Henrique Boll de Araujo Bastos

Coorientador

Prof. Dr. Gustavo Henrique Zimmermann Winter

Membro da banca

Msc. Verônica La Cruz Bueno

Membro da banca

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados fornecidos pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO (2017), o efetivo mundial de equinos é estimado em 60.566.601 de cabeças, das quais cerca de 54% encontra-se nas Américas. O Brasil com um total de 5.706.865 de cabeças ocupa a quarta posição em relação ao número de animais, perdendo apenas para os Estados Unidos, China e México, respectivamente (FAO, 2017).

O cavalo Crioulo originário do cruzamento das raças espanholas Andaluz e Jaca foram trazidos da península ibérica no século XVI pelos colonizadores. Estabelecidos na América do Sul, principalmente na Argentina, Chile, Uruguai, Paraguai, Peru e sul do Brasil, muitos destes animais passaram a viver livre. A partir disto a seleção natural imposta a estes animais imprimiram características marcantes, como a rusticidade e resistência (ABCCC, 2019).

O significativo avanço na equinocultura mundial está diretamente associado com a utilização e o desenvolvimento das biotecnologias da reprodução. O uso da inseminação artificial com sêmen congelado tem se tornado representativo para a maximização do potencial genético de garanhões zootecnicamente comprovados. A raça crioula, acompanhando este avanço, após 90 anos de existência, totaliza atualmente mais de 400 mil exemplares registrados distribuídos pelo território brasileiro (ABCCC, 2019).

Embora os primeiros relatos sobre congelamento de sêmen tenham sido feitos a mais de 200 anos por Spallanzani em 1776, que tentou congelar sêmen com a ajuda da neve (PESCH; HOFFMANN, 2007), a grande descoberta, que possibilitou os avanços nos estudos da criopreservação espermática, foi em relação ao potencial crioprotetor do glicerol (POLGE *et al.*, 1949).

O uso do sêmen congelado possibilita primariamente a manutenção e utilização do sêmen por tempo indeterminado, favorecendo a maximização do potencial genético de garanhões zootecnicamente superiores; reduz consideravelmente os custos relacionados ao deslocamento da égua; contribui para redução da transmissão de doenças contagiosas; possibilita a continuidade de estações reprodutivas em caso de injúrias ou participações do garanhão em competições; e minimiza o uso de garanhões geneticamente inferiores (AMANN e PICKETT, 1987; MILLER, 2008). Embora esta

biotécnica seja acompanhada por diversos benefícios, os resultados para muitos garanhões não levam a taxas satisfatórias de prenhez (AMANN; PICKETT, 1987). Sendo necessário, em média, dois a três ciclos e grande número de doses para obter uma prenhez (ALVARENGA; LEÃO, 2002). Essa desvantagem, em muitos casos, pode ser superada pela adoção de diferentes técnicas, tornando-se insignificante quando comparada às inúmeras vantagens do sêmen descongelado (MILLER, 2008).

Diferente de outras espécies domésticas de interesse zootécnico, os equinos são valorizados como indivíduo e animais de alto padrão genético atingem valores elevados de comércio e reprodução (CHOWDHARY *et al.*, 2008). Portanto, fatores fisiológicos e de capacidade reprodutiva muitas vezes são selecionados negativamente, o que leva a menores índices reprodutivos (LEON *et al.*, 2013). A fertilidade do garanhão possui alta importância econômica para a indústria equina e o grande desafio para aquele que tenta congelar sêmen equino é a grande variabilidade entre indivíduos (LOOMIS; GRAHAM, 2008). Fator este responsável pelo impulso à pesquisa de marcadores de fertilidade como demonstrado em outras espécies, tais como: humanos, camundongos e bovinos (BEDFORD-GUAUS; MCPARTLIN; VARNER, 2012). Em equinos a expressão gênica de PLC ζ e WPB2NL no espermatozoide, com a qualidade seminal e fertilidade de 40 garanhões da raça Crioula foi avaliada, comprovando que a expressão do gene PLC ζ no espermatozoide equino pode desempenhar diversos papéis na fisiologia do sêmen, assim como pode tornar-se um marcador para a qualidade seminal e fertilidade do garanhão (BUENO *et al.*, 2018).

Considerando a importância da criopreservação de sêmen e os seus impactos no crescimento dos rebanhos em quantidade e qualidade, o objetivo do presente estudo foi avaliar as características seminais de garanhões da raça Crioula após o processo de criopreservação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este tópico tem como objetivo revisar os principais assuntos referentes ao complexo processo de congelamento do sêmen equino, desde aspectos relacionados à endocrinologia reprodutiva do garanhão até a criopreservação do sêmen e suas peculiaridades.

2.1 Endocrinologia Reprodutiva do Garanhão

O sistema reprodutivo endócrino de animais caracterizados por períodos reprodutivos estacionais, assim como no garanhão, é iniciado ao nível da glândula pineal e pela liberação de melatonina. A melatonina é controlada por sinais luminosos captados pela retina e transmitidos via nervo óptico para a glândula pineal. Com o decréscimo da luminosidade captada, a glândula pineal produz mais melatonina, o que inibe a liberação de GnRH, resultando na redução das gonadotrofinas, dos hormônios esteróides e da atividade testicular (SHARP, 1993). Ao passo que o período de dia em relação à noite aumenta, a atividade reprodutiva do garanhão é estimulada pela diminuição da secreção de melatonina, o que confere aumento da liberação de gonadotrofina e da atividade testicular (CLAY *et al.*, 1988)

Diversos estudos demonstram a importante relação da melatonina com o status reprodutivo de diversas espécies animais, como relatado por Argo, Cox e Gray (1991) que aplicações de melatonina exógena diminuem a concentração de testosterona em garanhões. Assim como relatado por Karasek (1990) que elevados níveis de melatonina foram encontrados em homens com hipogonadismo ou infertilidade por oligospermia ou azoospermia.

Os principais hormônios relatados na fisiologia reprodutiva do garanhão tem sido o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido e secretado pelo hipotálamo, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), produzidos e secretados pela hipófise anterior, andrógenos e estrógenos produzidos e secretados pelas células testiculares de Leydig e, por fim, estrógenos e inibina, produzidos e secretados pelas células de Sertoli do testículo (ROSER, 2008). A natureza específica e a contribuição de diversos fatores envolvidos no controle endócrino-parácrino-autócrino de garanhões férteis não são bem definidos, assim como nos

garanhões com subfertilidade idiopática e infertilidade (DOUGLAS; UMPHENOUR, 1992).

O hipotálamo, parte do diencefalo do cérebro, aparenta estar envolvido em diversos acontecimentos fisiológicos dos animais, como no apetite e na sede, no controle da temperatura, na atividade do trato intestinal e bexiga, no sono e vigília, no comportamento sexual e liberação de hormônios tróficos. Esta liberação de hormônios tróficos tem o essencial papel para controlar a função reprodutiva (AMANN, 2011). Como observado em outras espécies, sob apropriado estímulo, o hipotálamo do garanhão libera GnRH de forma pulsátil, o qual estimula a produção e liberação de gonadotrofinas (IRVINE; ALEXANDER, 1987).

A fisiologia reprodutiva do garanhão, assim como de outras espécies mamíferas, é dependente do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, o qual envolve a secreção de hormônios provenientes da pituitária que, por meio da circulação sanguínea, atuam diretamente nos testículos (ROSER, 2008). Subseqüentemente hormônios testiculares são secretados de volta para a circulação para agirem como reguladores em forma de *feedback* nos hormônios hipotalâmicos e pituitários (MATSUMOTO, 1989).

O LH estimula a produção de testosterona (T) e andrógenos, ambos produzidos pelas células de Leydig. O FSH se liga às células de Sertoli para liberar estrogênio, inibina, proteína de ligação de androgênio (ABP), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e outros fatores essenciais para a espermatogênese (AMANN, 2011). Proteínas testiculares e hormônios esteróides retornam ao hipotálamo e a pituitária através da circulação periférica para modular a alta de GnRH, LH e FSH (MATSUMOTO, 1989).

A testosterona age em *feedback* negativo sobre a liberação do GnRH ao nível do hipotálamo. O estrogênio não tem seu mecanismo de ação no hipotálamo esclarecido no garanhão, embora tenha resultados de *feedback* negativo e positivo em diferentes espécies (TILBROOK; CLARKE, 2001).

2.1.1 Prolactina, Hormônios da Tireóide, Hormônios do Crescimento e Opióides

A prolactina, hormônio secretado pela adenohipófise, tem sido demonstrada como importante fator para regulação de diversos processos no garanhão. Segundo Hondo *et al.* (1995) a prolactina, juntamente com o LH e o hormônio do crescimento

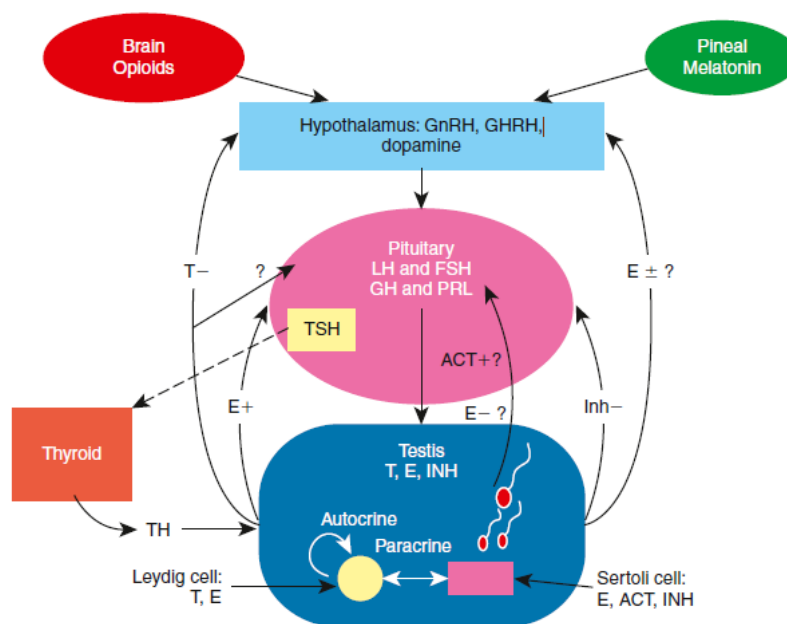
(GH), atuam no controle da síntese de receptores de LH no testículo, na síntese de andrógenos e afetam a espermatogênese. Isto se deve ao fato de que, aparentemente, a prolactina parece desempenhar um papel na indução da transcrição de receptores para estrógenos, o que afetaria tecidos sensíveis à andrógenos, acarretando nos diversos eventos citados.

O hormônio da tireóide atua nas células de Sertoli e de Leydig promovendo a sua diferenciação durante o desenvolvimento do garanhão (MENDIS-HANDAGAMA; ARIYARATNE, 2004). Nas células de Leydig o hormônio da tireóide atua no processo de transporte de colesterol pela membrana mitocondrial, já nas células de Sertoli está envolvido na indução da expressão de mRNA para hormônio Anti-Mulleriano, na secreção de aromatases, receptores de estradiol e ABP (COOKE *et al.*, 2004).

O hormônio do crescimento, produzido pela hipófise, tem sua função reprodutiva no garanhão sobre a modulação da síntese de hormônios esteróides e na gametogênese (MARAN, 2003). De acordo com Spiteri-Grech e Nieschlag (1992) baixo índices de GH estão diretamente associados com tamanhos testiculares anormais, e em humanos está relacionado com motilidade espermática reduzida ou ausente. O tratamento com suplementação de GH pode gerar um aumento na concentração plasmática de IGF-1 e restaurar a motilidade espermática (BREIER *et al.*, 1998).

No garanhão, bem como outras espécies, acredita-se que alterações sazonais na liberação de GnRH / LH são parcialmente reguladas pelos opióides. Opióides são secretados pelo cérebro, viajam para o hipotálamo, e causam uma diminuição na liberação de GnRH durante os meses de inverno (GERLACH; AURICH, 2000). Aurich e co-autores (1994) demonstraram que o tratamento com um antagonista opióide naloxona causou uma liberação aguda de LH em garanhões fora do período reprodutivo, mas não durante a época de reprodução. A regulação pelos opióides da liberação de LH parece exigir a presença de gônadas funcionais (Figura 1).

Figura 1 – Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal do macho.



Fonte: Roser, 2009.

2.2 Espermatozoide

O espermatozoide, considerado a célula germinativa masculina, inicia sua longa trajetória dentro dos testículos. O testículo é classicamente definido por possuir duas funções: (i) exócrina - espermatogênese e (ii) endócrina - produção de hormônios importantes para a espermatogênese, a diferenciação sexual, desenvolvimento de características sexuais secundárias, e libido (VARNER; JONHSON, 2011).

O espermatozoide é dividido em dois grandes segmentos, cabeça e flagelo. A cabeça pode ser subdividida em região acrossomal, segmento equatorial, região pós acrossômica e anel posterior, que demarca a união entre a cabeça e o flagelo (VARNER; JONHSON, 2011). O flagelo pode ser dividido em quatro partes: peça de conexão, peça intermediária, peça principal e peça final (Figura 2). Estas várias partes do espermatozoide são circundadas por uma única membrana plasmática (JOHNSON; AMANN; PICKETT, 1978).

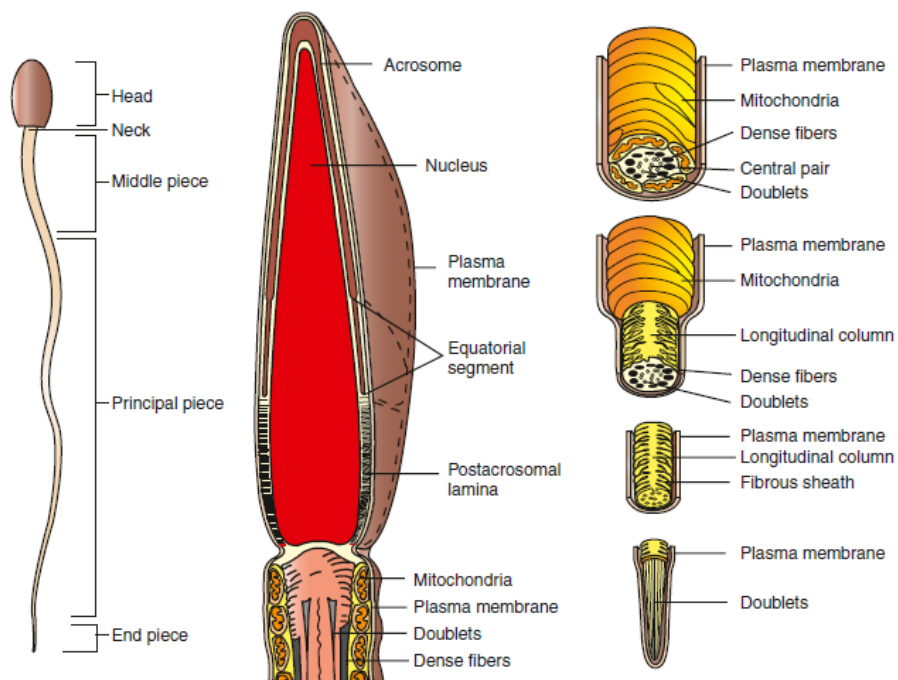
A membrana plasmática é constituída por uma bicamada fosfolipídica típica incorporando colesterol, um complexo de carboidratos e proteínas (LANGLAIS; ROBERTS, 1985). Embora seja relatada como componente externo de todo o espermatozoide, há três momentos que podemos perceber alteração neste padrão, como

durante a reação acrossômica - prelúdio à fertilização - senescência e morte celular (AMANN; GRAHAM, 2011).

O acrossoma localiza-se entre a membrana plasmática e o envelope nuclear, na porção anterior da cabeça, e possui seu próprio conjunto de membranas: a membrana acrossomal interna que circunda o envelope nuclear e a membrana acrossomal externa, que é coberta uda do espermatozoide, ou flagelo, é a região responsável por conferir motilidade ao espermatozoide, movimento essencial para que, dentro do trato genital feminino, possa realizar a fertilização na ampola do oviduto da égua (MEYERS, 2009). A peça intermediária do espermatozoide equino é tipicamente composta por cinquenta giros helicoidais de mitocôndrias que contêm enzimas e co-fatores responsáveis pela geração de ATP, convertidos posteriormente em atividade contrátil da cauda (AMANN; GRAHAM, 2011).

A célula espermática do equino possui estruturas similares ao descrito em touro, carneiro, cachorro e humano, por exemplo. O seu tamanho, em relação ao corpo, é notavelmente menor que de outras espécies, como o rato e o hamster (CUMMINGS; WOODALL, 1985). De acordo com Amann e Graham (1993) o espermatozoide equino possui de 60-65 μm no seu comprimento total, sendo que a cabeça possui apenas de 6-7 μm de comprimento e 4-5 μm de largura máxima.

Figura 2 – Diagrama de um espermatozoide equino.



Fonte: MEYERS, 2009 modificado de Amann; Pickett, 1987.

2.3 Espermatogênese

A espermatogênese é a soma das divisões celulares e das mudanças que resultam na formação de espermatozoides a partir de espermatogônias (AMANN, 2011) (Figura 3). Segundo Mann (1981) este processo pode ser subdividido em três partes: fase I, onde as espermatogônias, por processo mitótico, sofrem divisão para espermatócitos primários além de renovarem a população de espermatogônias. A fase II, compreende duas divisões meióticas sucessivas dos espermatócito primários, porém acompanhado por apenas uma duplicação de cromossomo, gerando no final quatro espermátides, cada uma contendo apenas metade do número somático de cromossomos. A terceira fase, compreende um complexo processo de transformação da espermátide em um espermatozoide.

Estas três fases da diferenciação celular também podem ser classificadas como espermatocitogênese, meiose e espermiogênese, respectivamente. No gananhão a espermatogênese tem um total de 57 dias de duração (VARNER; JONHSON, 2011). De acordo com Amman (2011) as respectivas etapas da espermatogênese tem duração de aproximadamente 19.4, 19.4 e 18.6 dias, respectivamente. Consequentemente, as células avançam em direção ao lúmen epitelial seminífero, distanciando-se da membrana basal

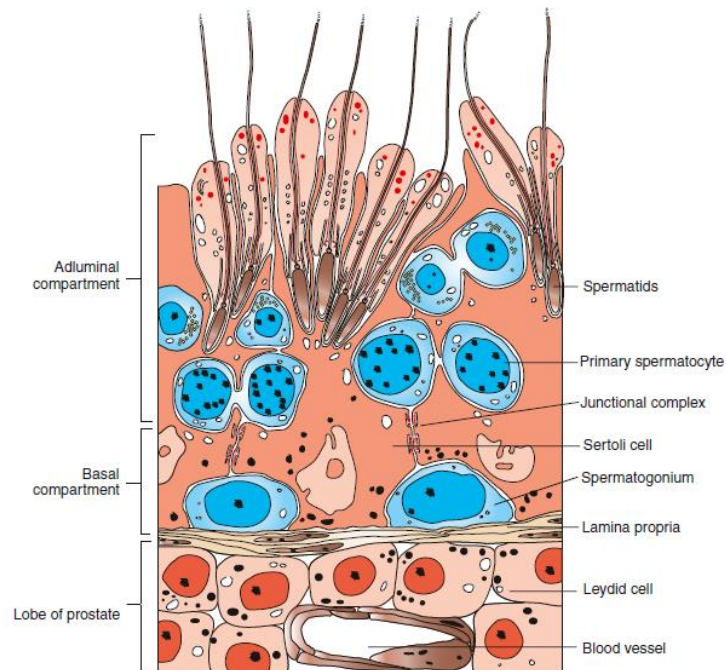
ao longo das sucessivas divisões celulares. Isto culmina na liberação de espermatídes no lúmen tubular, processo conhecido como espermição. Os espermatozoides são encaminhados para a região central do testículo, denominada rede testis, esta região é extensivamente ramificada e possui características de reservatório espermático. Estes espermatozoides, por meio dos túbulos eferentes alcançam o epidídimo, região responsável pela maturação espermática e pelo principal reservatório de espermatozoides (MEYERS, 2009).

A espermatogênese pode ser avaliada qualitativamente pela aparência geral dos túbulos vistos em secções histológicas e quantitativamente por contagem de diferentes tipos de células germinativas em secções transversais dos túbulos (JOHNSON, 1986). De acordo com Swierstra *et al.* (1974), os túbulos seminíferos no touro ocupam cerca de 76% do volume testicular, 77% nos bodes e 84% nos cães. Já os equinos possuem cerca de 70% do volume testicular ocupado por túbulos seminíferos, maior do que ratos (60%) e humanos (40%) (JOHNSON, 1986).

A célula de Sertoli é caracterizada como componente somático do epitélio dos túbulos seminíferos e possui papel importante no desenvolvimento germinativo das células durante a espermatogênese. Além do suporte físico gerado, as células de Sertoli fornecem nutrientes e fatores reguladores para as células germinativas iniciais. (JOHNSON; GRIFFIN; MARTIN, 2011)

Dentro do tecido intersticial, as células de Leydig encontram-se em proximidade dos vasos sanguíneos e linfáticos. A sua função primária baseia-se na secreção de hormônios esteróides, os quais regulam a função dos túbulos seminíferos, do eixo hipotalâmico-hipofiseal e das glândulas acessórias sexuais (AMANN, 2011). Dentre os hormônios esteróides produzidos pelas células de Leydig a testosterona é o de maior importância e quantidade (SILBERZAHN, 1988).

Figura 3 - Desenho de uma seção de um túbulo seminífero do garanhão mostrando a relação das células germinativas e células de Sertoli adjacentes no epitélio seminífero.



Fonte: Pickett, 1989.

2.4 Resfriamento de Sêmen

A utilização da inseminação artificial com o sêmen resfriado tem se tornado cada vez mais popular na indústria equina. A sua aceitação dentro das associações de raças resultou em uma tecnologia popular e de grande aceitação. O principal objetivo é manter a célula espermática viável por um período maior de tempo (GRAHAM, 2011a). Durante o processo de preservação por resfriamento do sêmen, o espermatozoide passa por uma série de eventos deletérios pelo efeito da exposição a diferentes compostos químicos e principalmente pela variação de temperatura (BRINSKO, 2011).

Dentre os diversos benefícios gerados pela utilização desta tecnologia, pode-se destacar o incremento genético pelo uso de sêmen de garanhões zootecnicamente superiores, a redução dos custos e estresse gerados pelo transporte das éguas e o aumento do número de éguas que poderão ser inseminadas por apenas um garanhão (PICKETT, 1993). Eventualmente observam-se desvantagens na sua utilização, como

por exemplo, reduzidas taxas de prenhez, aumento nos custos de produção e gananhões com sêmen extremamente sensível a este processo de preservação (PICKETT, 1993).

Para entender como o sêmen do ganhão deve ser resfriado, incluindo a compreensão da utilização de diferentes diluentes para resfriamento, é necessário que se entenda cada componente utilizado nos diversos diluentes disponíveis no mercado. Bem como compreender os mecanismos utilizados para resfriar, armazenar, aquecer e utilizar os espermatozoides com sucesso posteriormente. Os acontecimentos a nível celular durante o processo de resfriamento são fundamentais para conferirem sucesso à técnica (GRAHAM, 2011a).

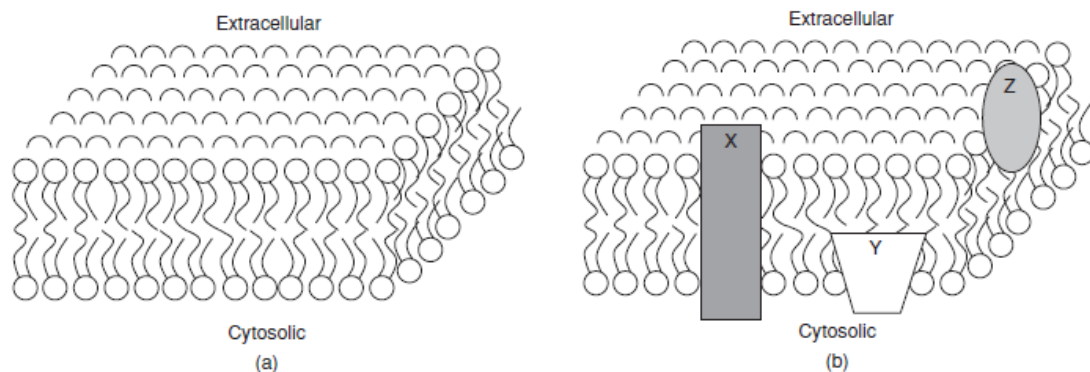
Em 1972 foi demonstrado por Singer o modelo de mosaico fluido da estrutura das membranas celulares. Este modelo descreve membranas celulares como uma bicamada dinâmica de fosfolipídios polares. Os fosfolipídios nesta bicamada são orientados com seus grupos de cabeça hidrofílica para fora da membrana, enquanto que os canais de ácidos graxos, pela característica hidrofóbica, são orientados para o interior da membrana (Figura 4a) (GRAHAM, 2011a).

As proteínas são componentes da membrana celular e compõem cerca de 50% do peso da membrana. Perfazem porções integrais e parciais da membrana, atuando, respectivamente, como canais de transporte e receptores de outras proteínas (Figura 4b) (AMANN; GRAHAM, 1993).

O último e principal componente da membrana em relação ao processo de resfriamento dos espermatozoides é o colesterol (GRAHAM, 2011a). O colesterol é capaz de preencher qualquer lacuna criada no núcleo da membrana devido à movimentação constante dos fosfolipídios. O colesterol, portanto, intercala-se na porção dos ácidos graxos, e ajuda a estabilizar a membrana à temperatura do corpo (LANGLAIS; ROBERTS, 1985).

A capacidade dos fosfolipídios de se moverem em toda a membrana fornece uma característica dinâmica, a qual é importante na função geral da membrana. À medida que os lipídios e proteínas se movem ao longo da membrana há interações com outros lipídios e proteínas, e são essas interações que permitem a formação de canais de íons e a sinalização de receptores e transportadores de proteínas para funcionar normalmente (GRAHAM, 2011a).

Figura 4 – Estrutura geral da membrana plasmática.



(a) bicamada fosfolipídica, (b) camada lipídica com (x) proteínas integrais e com (y, z) proteínas periféricas.

Fonte: Graham, 2011.

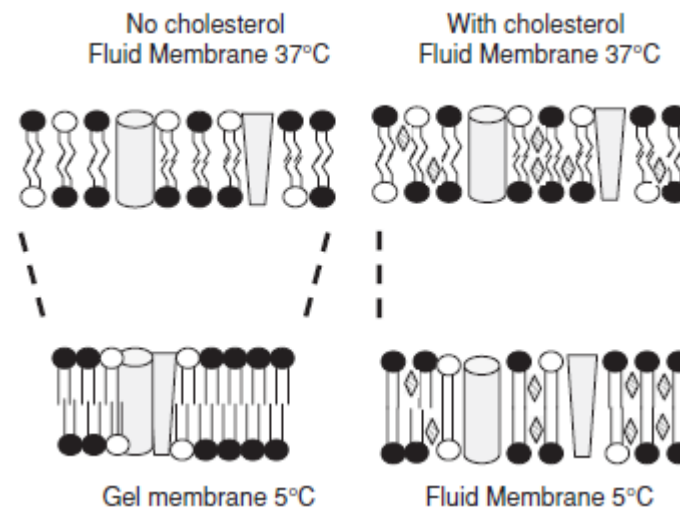
Quando a célula é resfriada, os lipídios passam por uma fase de transição do estado fluido para o estado de gel ou estado sólido. Cada cadeia de ácido graxo sofre esta transição em temperaturas diferentes. Cadeias longas necessitam menor redução de temperatura para sofrer a transição de estado fluido para sólido, já cadeias curtas necessitam maior redução de temperatura para que haja a transição (GRAHAM, 2011a).

Com a redução progressiva da temperatura a membrana chega à faixa de temperatura de transição de fase, estabelecida em 19°C no espermatozoide equino (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990). Fisicamente, quando uma membrana é resfriada, os movimentos de rotação e vibração dos fosfolípídios se tornam lentos, e à medida que a fase de transição ocorre, as forças de Van der Waals entre os canais de ácidos graxos tornam as moléculas mais próximas umas das outras (Figura 5) (GRAHAM, 2011a).

A redução da fluidez da membrana demonstra o principal efeito do colesterol sobre todo o processo. Quando a temperatura alcança níveis reduzidos em relação à faixa de transição da membrana, o colesterol age reduzindo a força coesiva entre as cadeias de ácidos graxos e forçando a separação dos fosfolípídios adjacentes. Ambos os processos permitem que a membrana se mantenha mais fluida (GRAHAM, 2011a). Portanto, quando o colesterol é adicionado ao meio, a temperatura de transição de fase da membrana é reduzida. De acordo com Hammerstedt, Graham e Nolan (1990), se suficiente quantidade de colesterol for incluída, as membranas não passam por transição de fase a qualquer temperatura testada. Portanto, embora o colesterol diminua a fluidez da membrana em altas temperaturas, aumenta a fluidez em baixas temperaturas, diminuindo a temperatura na qual a membrana passa por uma transição de fase ou até mesmo anula

esta etapa, o que permitiria a manutenção do maior grau da composição da membrana (Figura 5) (GRAHAM, 2011a).

Figura 5 – Estrutura de membrana em estado fluido (37°C) e em estado gel (5°C), demonstrando o efeito do colesterol na interação entre lipídios.



Fonte: Graham, 2011.

Os danos celulares, causadas pelo frio, podem ser induzidas diretamente por alterar ou romper as estruturas celulares, ou indiretamente por alterar as funções celulares (WATSON, 1981a). Os danos causados à membrana do espermatozoide equino pela rápida exposição ao frio atuam diretamente na perda de lipídios para o meio extracelular, causando perda de íons e moléculas (GRAHAM, 2011a). Este processo conduz a uma redução no metabolismo celular, padrões de movimento circular e perda progressiva na motilidade espermática (WATSON, 1981a). Este efeito significativo sobre a célula é conhecido como choque térmico e tem grande influência sobre a viabilidade do sêmen (WATSON, 1981b).

Os principais danos causados pelo resfriamento são constituídos pelo rearranjo das interações entre lipídio-lipídio e lipídio-proteínas, após o aquecimento da amostra as interações se restabelecem, porém não em sua totalidade. A grande diferença entre os danos gerados pelo choque térmico e pelo resfriamento baseia-se na magnitude dos danos, os quais são mais intensos durante o choque térmico (GRAHAM, 2011a).

A partir do conhecimento da faixa de transição do estado físico das membranas celulares, Moran *et al.* (1992) demonstraram que o resfriamento do sêmen da

temperatura corporal do equino (38°C) até 19°C pode ser realizado de forma rápida. Após alcançar 19°C o resfriamento deve alcançar uma taxa de resfriamento lenta (-0,05°C/min) até a marca dos 9°C. A redução de temperatura subsequente até os 5°C pode ser realizada de forma rápida. Contrariamente, diferentes taxas de aquecimento do sêmen, até que atinjam a temperatura corporal, são menos críticas ao espermatozoide que o resfriamento (GRAHAM, 2011a).

Em muitos ganhos o elevado número de espermatozoides no ejaculado se torna necessário para a máxima fertilidade, porém, com o aumento de popularidade de certos animais, se tornou necessário o uso de menor dose inseminante, o que acarretou em estudos para desenvolvimento de recipientes capazes de manter a temperatura constante por maior período de tempo (SAMPER, 2011).

2.5 Congelamento de Sêmen

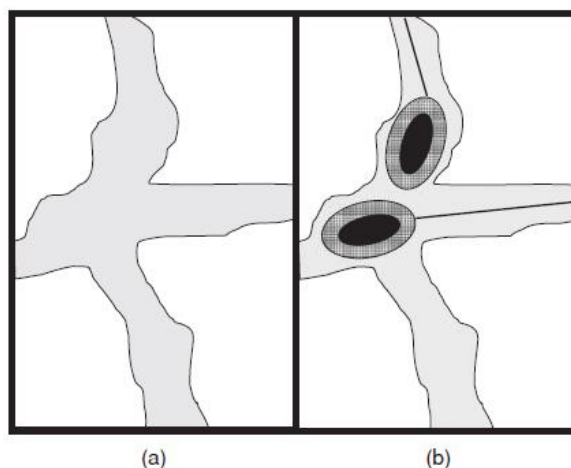
Embora Spallanzani tenha sido o primeiro a tentar congelar sêmen em 1776 (PESCH; HOFFMANN, 2007), apenas Polge e colaboradores (1949) demonstraram resultados significativos no processo de congelação de sêmen equino. Fato este ocorrido pelo estudo detalhado do glicerol como agente crioprotetor. Pouco tempo depois o sêmen de muitos mamíferos, aves, peixes, pôde ser congelado com sucesso (GRAHAM; SCHMEHL; DEYO, 1984). No entanto o sêmen de algumas espécies e de alguns machos dentro de cada espécie, sobrevivem melhor ao processo de criopreservação (GRAHAM, 2011b).

Os princípios que regem o processo de criopreservação do espermatozoide são semelhantes para todo tipo de criopreservação celular. Durante o processamento do sêmen é essencial que a maior quantidade de água intracelular seja removida para o meio extracelular, antes do congelamento. Caso isso não ocorra, grandes cristais intracelulares de gelo são formados resultando em sérios danos às células, frequentemente, até levando a sua morte (SEIDEL, 1996). Este transporte do meio intracelular para o meio extracelular é realizado majoritariamente pelos canais de transporte de água, denominados aquaporinas. As aquaporinas são proteínas de canal de água que aumentam a permeabilidade da bicamada lipídica da membrana celular à água (FERREIRA, 2014). Além do transporte de água, algumas destas proteínas desempenham o papel de transporte de glicerol para o interior das células, auxiliando no

processo de criopreservação celular. Outros estudos também sugerem o potencial de transporte de outras pequenas moléculas e gases, como aminoácidos e dióxido de carbono (VERKMAN, 2011).

No entanto, quando uma solução contendo sais e açúcares é resfriada abaixo do seu ponto de congelamento, os cristais de gelo formados contêm apenas moléculas de água e estes são separados uns dos outros por canais de água não congelados que contêm todos os sais e açúcares (Figura 6). Para que as células sobrevivam à criopreservação, elas devem residir nestes canais, sendo que as células que ficam presas nos cristais de gelo morrem (GRAHAM, 2011b).

Figura 6 – Representação de uma solução congelada.



Cristais de gelo de água pura (branca) e canais de água hipertônica (cinza) que são descongelados (a). Célula espermática localizada no espaço de maior volume (b)
 Fonte: Graham, 2011b.

À medida que a temperatura é reduzida, mais água é retirada dos canais descongelados, tornando a solução cada vez mais hipertônica, a concentração de sal pode aumentar ao ponto que as membranas celulares, organelas e proteínas sejam irreparavelmente danificadas, levando à morte celular (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990).

A adição de solutos à água leva a uma diminuição do ponto de congelamento da solução. Sendo assim, enquanto a água pura congela a 0 °C, solução salina fisiológica (300mOsm) congela a -0,6 °C. Se o soluto adicionado for um líquido, como os crioprotetores etilenoglicol, glicerol, ou metil formamida, o ponto de congelamento é

similarmente deprimido, mas como esses compostos permanecem descongelados a baixas temperaturas, contribuirão para a manutenção do volume dos canais descongelados entre os cristais de gelo. Portanto, estes compostos são responsáveis por aumentar o volume total dos canais descongelados e diminuir a concentração de sal observada pelas células, diminuindo assim os efeitos deletérios de ambos (GRAHAM, 2011b).

A sobrevivência da célula ao processo de congelamento é dependente de diversos fatores, porém destaca-se a relação da permeabilidade da membrana plasmática com o meio em detrimento à taxa de congelamento da solução. Se as células são resfriadas rapidamente a formação de gelo extracelular é iniciada precocemente, mantendo grande quantidade de água dentro das células, e a conseqüente formação de cristais intracelulares. Caso esta taxa de resfriamento seja realizada de forma lenta, as células podem ser expostas a condições excessivas de hipertonicidade, causando danos à membrana e organelas (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990).

Após a coleta e avaliação inicial, o ejaculado é diluído em diluente de sêmen para a posterior centrifugação. Após a centrifugação, os espermatozoides são diluídos em diluentes de criopreservação contendo crioprotetores. Neste momento inicia-se o primeiro desequilíbrio osmótico levando a uma rápida redução do tamanho celular, com a estabilização do equilíbrio osmótico, as células recuperam seu tamanho original (GRAHAM, 2011b).

Após o processamento da amostra, o sêmen é envasado em palhetas de 0,5 ou 0,25ml. Resfriado até que chegue à temperatura de 5°C, posteriormente as palhetas são depositadas no vapor do nitrogênio líquido, a uma altura de 4 cm. A última etapa culmina na submersão das palhetas em nitrogênio líquido (GRAHAM, 2011b). Este mesmo procedimento pode ser realizado com auxílio de uma máquina de congelamento de sêmen, onde a curva de congelamento pode ser editada (CLULOW, 2008).

Pelo fato da seleção de ganhões não ser realizada a partir de seus méritos reprodutivos, constata-se grandes variações individuais em relação à capacidade de congelamento do sêmen. Geralmente acredita-se que a chave para o sucesso da criopreservação de sêmen equino é o próprio ganhão (GRAHAM, 2011). A partir desta característica Tischner (1979) avaliou, pós descongelamento, 200 ejaculados de 36 ganhões chegando à conclusão de que os ganhões podem ser categorizados em três

diferentes grupos de acordo com a motilidade espermática: Bom >40% de motilidade progressiva; aceitável ou razoável 20-40%; ruim < 20%.

Ao comparar protocolos de diferentes países, os métodos de congelamento do sêmen e instruções do ganhão para inseminação de éguas com sêmen congelado estão longe de ser padronizados. A falta de padronização é demonstrada pelas diferenças no processamento, embalagem, e descongelamento de sêmen para criopreservação (SAMPER; MORRIS, 1998).

2.6 Diluentes de Sêmen

Com as atuais técnicas de processamento de sêmen, a fertilidade do sêmen resfriado de ganhão geralmente pode ser mantida não mais do que 24-48 horas. Depois deste período as taxas de prenhez reduzem drasticamente. A longevidade da viabilidade dos espermatozoides é influenciada por diversos fatores, como: composição do diluente, temperatura de armazenamento, exposição ao oxigênio, presença de bactérias, presença e tipo de antibióticos no diluente e concentração de plasma seminal (AURICH, 2011).

Para preservação da integridade de membrana plasmática e da cromatina do espermatozoide (AURICH, 2011), os diluentes de sêmen adequadamente formulados devem conter ingredientes que protejam os espermatozoides contra o choque térmico, fornecer substrato metabolizável e inibir ou eliminar o crescimento bacteriano, mantendo um pH de 6,7-7,2 e uma pressão osmótica de 300-400 mOsmol/l (BRINSKO, 2011).

Em 1975, Kenney formulou um diluente à base de leite desnatado que foi responsável pelo grande incremento do uso da inseminação artificial na época. A partir destes estudos diversas formulações foram desenvolvidas e estão comercialmente disponíveis (BRINSKO, 2011).

Os diluentes comerciais disponíveis, em sua maioria, dispõem de antibióticos para o controle do crescimento bacteriano, porém alguns modelos são comercializados sem a presença do antibiótico para que possa ser adicionado o antibiótico de eleição que melhor se enquadre para cada ganhão (BRINSKO, 2011). Kenney em 1975 demonstrou que a combinação de antibióticos em diluentes feita com sulfato de

amicacina (1mg/ml) e penicilina G potássica (1000U/ml) resultou nos melhores resultados de controle bacteriano e características seminais.

A grande utilização dos diluentes a base de leite desnatado e os posteriores estudos demonstraram que a composição do leite, embora complexa, apresentava componentes benéficos e maléficos aos espermatozoides. A fosfocaseína inata do leite foi determinada como componente de maiores efeitos protetores aos espermatozoides (BATELLIER, 1997).

2.7 Crioprotetores

Diluentes destinados para o congelamento são caracterizados por possuírem nutrientes como fonte de energia (açúcares), uma fonte de lipoproteína (leite, gema de ovo ou ambos) para proteção das membranas durante o resfriamento rápido, antibióticos para inibir o crescimento bacteriano, soluções tampões para equilibrar o pH e a pressão osmótica, e crioprotetor (SIEME, 2011b).

Um crioprotetor pode ser definido como qualquer substância que quando adicionado às células antes do congelamento, reduz os efeitos prejudiciais à célula. Existem duas classes principais de crioprotetores, aquelas que são impermeáveis à membrana plasmática da célula e as permeáveis (GRAHAM, 2011b).

Crioprotetores não permeáveis incluem açúcares (lactose, rafinose e sacarose), lipoproteínas (gema de ovo, leite e soro) e outras moléculas (metilcelulose e álcool polivinílico). Estas moléculas podem interagir com os componentes da membrana plasmática ajudando a estabilizá-la, mas o seu principal efeito é criar um ambiente hiperosmótico, que induzirá a desidratação celular (GRAHAM, 2011b).

Crioprotetores permeáveis à membrana, como o etilenoglicol, glicerol, dimetilsulfóxido e várias amidas, são geralmente mais eficazes que crioprotetores não permeáveis, porque afetam várias propriedades da célula e da solução (GRAHAM, 2011b). Primeiramente, substituem a água de dentro da célula, desidratando-a, inibindo a futura formação de cristais de gelo intracelulares. Além disso, aumentam os canais descongelados entre os cristais de gelo extracelulares, aumentando o espaço disponível para as células e diminuindo a concentração de sais na solução não congelada (MERYMAN, 2007).

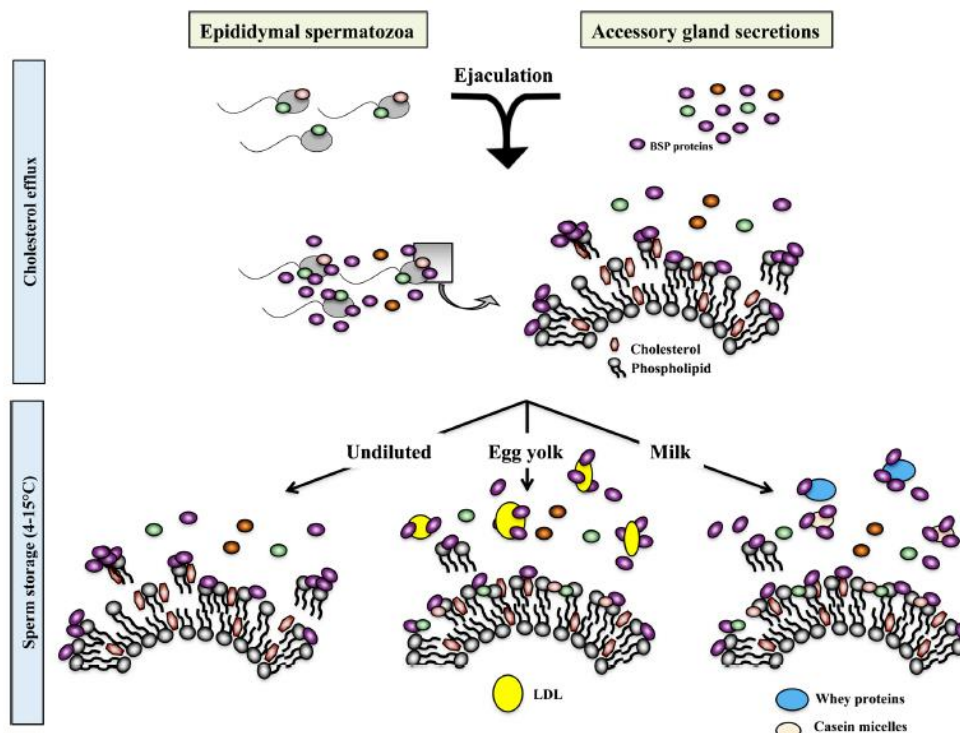
Até a atualidade nenhum diluente para congelamento foi considerado como superior para este propósito (SIEME, 2011b). Porém, de acordo com a pesquisa de Samper e Morris (1998) os dois diluentes para congelamento mais utilizados foram lactose-EDTA e Inra 82 com variações de concentração de gema de ovo e glicerol.

Lipídios da gema de ovo e, em menor grau, do leite, são os principais lipídios presentes em diluentes de congelamento de sêmen equino. Embora os seus mecanismos de ação não sejam bem estabelecidos (SIEME, 2011b). Porém, Manjunath e colaboradores (2002) estabeleceram que a ação protetora da gema de ovo ao espermatozoide é estabelecida pela interação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) com proteínas específicas do plasma seminal, responsáveis pela indução do efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana. Este fato ocorre durante o processo de capacitação espermática, desaconselhado durante a preservação do sêmen.

O mecanismo proposto para proteção do espermatozoide pelo leite é análogo ao da gema de ovo, porém como o leite desnatado quase não contém lipídios na sua composição as interações com as proteínas do plasma seminal são feitas pelas micelas de caseína, principal proteína do leite (PLANTE, 2016). De acordo com Lusignan *et al.* (2011) as proteínas do plasma seminal podem interagir com outras proteínas do leite como a α - lactoalbumina e β -lactoglobulina (Figura 7).

A capacidade de ligação das LDL às proteínas do plasma seminal é elevada, uma partícula de LDL é capaz de ligar 104 ± 5 proteínas do plasma seminal. Diferentemente da LDL, as caseínas do leite possuem baixa capacidade de ligação às proteínas do plasma seminal, totalizando cerca de 4 a 5 proteínas por molécula de caseína (LUSIGNAN *et al.*, 2011).

Figura 7 – Mecanismo de proteção espermática pelo leite e gema de ovo.



Fonte: Plante, 2016.

O glicerol foi o primeiro crioprotetor identificado e permanece atualmente com o título de crioprotetor mais utilizado. A sua concentração varia entre diferentes diluentes, portanto, a sua quantidade ótima para melhorar a qualidade espermática pós descongelamento ainda não foi estabelecida (SIEME, 2011b). A toxicidade do glicerol é parcialmente baseada no estresse osmótico, uma vez que o glicerol permeia a membrana celular mais lentamente do que outros crioprotetores (GILMORE *et al.*, 1995). Portanto é necessário que seja encontrado um equilíbrio entre o efeito crioprotetor e o efeito negativo do glicerol. De acordo com diversas pesquisas a concentração final de glicerol não deve exceder o intervalo de 2,5 a 3,5% (SIEME, 2011b).

2.8 Plasma Seminal

O plasma seminal é uma mistura de secreções produzidas pelos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias em diferentes frações líquidas. A composição do plasma seminal e a longevidade efetiva dos espermatozoides variam entre frações e

garanhões individualmente (KARESKOSKI; KATILA, 2008). Os ejaculados de garanhões são formados por seis a nove frações consecutivas de sêmen, com cerca de 70% dos espermatozoides nos três primeiros jatos ejaculatórios (KOSINIAK, 1975).

A emissão do líquido seminal das glândulas sexuais acessórias para a uretra pélvica foi estudada através da utilização da ultrassonografia transretal (WEBER; WOODS, 1993). As secreções de ampola e próstata iniciam antes do início da ejaculação. As secreções das glândulas vesiculares foram liberadas após o fim da atividade prostática. A liberação de fluido das glândulas bulbouretrais não foi observada durante a ejaculação. Outro estudo utilizou parâmetros biofísicos como marcadores para as lesões das glândulas sexuais acessórias para determinar a sequência em que as diferentes glândulas contribuem para o ejaculado, e os resultados corresponderam bem ao estudo ultra-sonográfico. O líquido bulboureteral foi o primeiro a ser secretado (líquido pré-espermatozoide), e então as secreções epididimais e ampulares apareceram nas primeiras frações do fluido ejaculado rico em espermatozoides e o líquido das vesículas seminais formou as últimas frações ejaculatórias (MAGISTRINI *et al.*, 2000).

A presença do plasma seminal no sêmen, de acordo com diversas pesquisas, demonstrou efeitos negativos sobre o espermatozoide resfriado e congelado. Quando a proporção de plasma seminal é reduzida para cerca de 5%, os espermatozoides são capazes de manter a motilidade mais desejável em comparação com amostras contendo uma maior proporção de plasma seminal (10-30%), durante o armazenamento refrigerado e criopreservado (JASKO *et al.*, 1991; BRAUN *et al.*, 1994; ALGHAMDI *et al.*, 2002).

As proteínas ligadoras de espermatozoides (BSP), encontradas em grande quantidade no plasma seminal, possuem diversas funções, destacando-se o importante papel na capacitação espermática. Além disso, as proteínas BSP podem se ligar às lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo e componentes do leite, como descrito anteriormente, resultando em uma interação importante para a preservação dos espermatozoides resfriados ou congelados (PLANTE *et al.*, 2016). Esta interação é de fundamental importância para a preservação das células, pois evita o início do processo de capacitação espermática, visto que os efeitos prejudiciais do plasma seminal e das BSP são tempo dependentes (MANJUNATH *et al.*, 2002).

3. ARTIGO

Artigo para publicação na revista Brasileira de Reprodução Animal

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS PÓS-DESCONGELAMENTO EM GARANHÕES DA RAÇA CRIOULA

Leonardo Glaeser Paul^{1,*}, Verônica La Cruz Bueno^{1,2}, Gustavo Rupp Larentis¹, Luiz Augusto Machado Centeno¹, Sandra Fiala Rechsteiner^{1,2}, Henrique Boll de Araujo Bastos¹, Rodrigo Costa Mattos^{1,2}

¹REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil; ²HISTOREP - Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas-RS, Brasil;

*E-mail: leopaul16@hotmail.com

3.1 Resumo

O uso da inseminação artificial com sêmen congelado possibilita a conservação e utilização do material genético de reprodutores por tempo indeterminado, e favorece a difusão, oportunizando a maximização do potencial genético de garanhões zootecnicamente superiores. Este trabalho teve como objetivo avaliar as características seminais de garanhões da raça Crioula após o processo de criopreservação. Foram utilizados ejaculados de 24 garanhões da raça Crioula, localizados próximo a Porto Alegre, RS, Brasil. As análises microscópicas foram realizadas pré e pós-congelamento através do sistema Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision®. Foi realizada a concentração espermática, a análise da integridade física da membrana e a funcionalidade da membrana plasmática (HOST). Somente foram utilizadas amostras com motilidade total $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 . Todas as amostras foram submetidas ao processo de criopreservação. Valores médios e desvios padrão das variáveis pós-congelamento: HOST (42,73% \pm 7,06); fluorescência (48,06% \pm 8,99); motilidade total (52,85% \pm 7,27); motilidade progressiva (31,15% \pm 10,21); motilidade rápida (4,78% \pm 5,37); imóveis (45,04% \pm 8,86); velocidade curvilínea (97,67 μ m/s \pm 35,25); velocidade linear progressiva (35,33 μ m/s \pm 15,29). Concluímos que o protocolo utilizado para a criopreservação é viável para utilização no sêmen de cavalos da raça Crioula, seguindo a recomendação mínima dos parâmetros seminais pós-congelamento do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

Palavras chaves: criopreservação, espermatozoides, fertilidade, equino.

3.2 Abstract

Artificial insemination with froze semen, allows the conservation and utilization of genetic material of breeders for an indefinite period, and favors the diffusion, allowing the maximization of the genetic potential of zootechnically superior stallions. The aim of this study was avaliation of ejaculates of Crioulo breed, placed near to Porto Alegre, RS, Brasil. Were used ejaculates of 24 stallions of the Crioulo breed, located near Porto Alegre, RS, Brazil. Microscopic analyzes were performed pre and post-freezing through the Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision® system. Sperm concentration, membrane integrity and plasma membrane functionality (HOST) were performed. Only samples with total motility $\geq 60\%$ and vigor ≥ 3 were used. All samples were submitted to the cryopreservation process. Mean values and standard deviations of post-freeze variables: HOST (42.73% +7.06); fluorescence (48.06% +8.99); total motility (52.85% + 7.27); progressive motility (31.15% + 10.21); rapid motility (4.78% + 5.37); real estate (45.04% + 8.86); curvilinear velocity (97.67 + 35.25); progressive linear velocity (35.33 + 15.29). We conclude that the protocol used for cryopreservation is viable for use in the semen of Crioulo breed, following the minimum recommendation of the post-freezing semen parameters of the Brazilian College of Animal Reproduction.

Keywords: cryopreservation, sperm, fertility, equine.

3.3 Introdução

O aumento da qualidade da raça crioula está diretamente associado ao desenvolvimento de biotecnologias aplicadas à reprodução. De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos, o número de animais registrados é superior a 400 mil exemplares em âmbito nacional. O crescimento do uso da inseminação artificial com sêmen congelado é decorrente da liberação do uso por diversas associações de criadores (ALVARENGA; LEÃO, 2002).

O uso do sêmen congelado possibilita primariamente a manutenção e utilização do sêmen por tempo indeterminado, favorecendo a maximização do potencial genético de garanhões zootecnicamente superiores; reduz consideravelmente os custos relacionados ao deslocamento de égua; contribui para redução da transmissão de doenças contagiosas; possibilita a continuidade de estações reprodutivas em caso de injúrias ou participações do garanhão em competições; e minimiza o uso de garanhões geneticamente inferiores (AMANN e PICKETT, 1987; MILLER, 2008).

Embora esta biotécnica seja acompanhada por diversos benefícios, os resultados para muitos garanhões não levam a taxas satisfatórias de prenhez (AMANN; PICKETT, 1987). Sendo necessário em média, dois a três ciclos e grande número de doses para obter uma prenhez (ALVARENGA; LEÃO, 2002). Essa desvantagem, em muitos casos, pode ser superada pela adoção de diferentes técnicas, tornando-se insignificante quando comparada às inúmeras vantagens do sêmen descongelado (MILLER, 2008).

O sucesso da criopreservação está associado diretamente com as diferenças inerentes ao espermatozoide em sobreviverem ao processo de criopreservação (LOOMIS; GRAHAM, 2008). Estas diferenças não são notadas apenas entre diferentes espécies, mas também entre machos de uma mesma espécie (DARIN-BENNETT; WHITE, 1977). Tal característica é fortemente evidenciada nos garanhões devido ao seu processo de seleção. Os garanhões, diferentemente de outras espécies de interesse zootécnico, são selecionados pelo desempenho esportivo e pela sua genealogia (VARNER *et al.*, 2008). O aspecto reprodutivo na maioria das vezes não é levado em consideração (SIEME; DISTL, 2012). Samper e Morris (1998) enviaram questionários para veterinários autônomos e laboratórios de 14 países, com o intuito de buscar um padrão no processamento do sêmen congelado. O resultado das 21/25 pesquisas enviadas (84%) demonstrou que o procedimento estava distante de adquirir uma padronização

em relação às etapas de pré-congelamento, congelamento, descongelamento e pós-descongelamento.

Considerando a importância da criopreservação de sêmen e os seus impactos no crescimento dos rebanhos em quantidade e qualidade, este trabalho teve como objetivo avaliar as características seminais de garanhões da raça Crioula após o processo de criopreservação.

3.4 Materiais e Métodos

Foram utilizados 24 garanhões da raça Crioula, com idade entre 4 e 18 anos, com peso entre 450 e 500 kg, alimentados com concentrado e feno de alfafa diariamente, água e sal *ad libitum*. Os garanhões, dos quais foi coletado um ejaculado, localizavam-se nas proximidades de Porto Alegre (30°S, 51°W), RS, Brasil.

Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas com número 2753-2018.

Para a coleta do sêmen dos animais, utilizou-se vagina artificial modelo Hannover com lubrificação e pré-aquecimento (42 – 45°C). Após a coleta, a amostra de sêmen foi filtrada e encaminhada para o Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sem uso de diluidores de sêmen, com limite máximo de duas horas.

A concentração espermática foi avaliada por meio de câmara de Neubauer (BRITO, 2007). As avaliações de Motilidade Total (%) (MT), Motilidade Progressiva (%) (MP), Motilidade Rápida (%) (MR), Motilidade Lenta (%) (ML), Motilidade Local (%) (MC), Imóveis (%); Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), Velocidade em Linha Reta (VSL, $\mu\text{m/s}$), Velocidade Curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), Linearidade (LIN, $\mu\text{m/s}$), Frequência de Batimento do Flagelo (BCF, $\mu\text{m/s}$), Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, $\mu\text{m/s}$), foram realizadas através do sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis, AndroVision®, Minitube, Tiefenbach, Alemanha).

Para a análise da integridade de membrana plasmática, 400 μL de sêmen foram incubados com 3 μL de iodeto de propídio (PI) e 2 μL de diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), a 37°C por oito minutos. A amostra foi avaliada por microscopia de epifluorescência, em aumento de 1000 x, sob imersão. Um total de 100 espermatozoides por

amostra foi avaliado. Foram considerados íntegros aqueles espermatozoides que apresentaram coloração verde (GARNER *et al.*, 1986).

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico. Para tanto, 200 μ L de água destilada foram adicionados a 100 μ L de sêmen (osmolaridade: 100mOsmol kg⁻¹). As amostras foram incubadas a 37°C por oito minutos, posteriormente, as amostras de sêmen foram analisadas em microscópio de contraste de fase em aumento de 400x. Foram avaliados 100 espermatozoides por amostra e foram considerados íntegros os espermatozoides em que houve um enrolamento da cauda (LAGARES *et al.* 1998).

As amostras, após confirmação de motilidade total $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 , foram submetidas à centrifugação de 600 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi removido. O pellet formado foi ressuspendido com diluente comercial próprio para congelamento (BotuCrio®) composto por gema de ovo, glicerol e dimetilformamida, previamente aquecida a 37°C até a concentração de 200 milhões de espermatozoides por mililitro.

As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 ml e lacradas com álcool polivinílico. A primeira etapa do congelamento foi realizada em refrigerador comercial a 5°C por 20 minutos. Logo após, as palhetas foram acondicionadas em estante específica para congelamento de sêmen ao vapor de nitrogênio por 20 minutos. Sendo finalmente imersas em nitrogênio líquido. Para fins de avaliação as amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundo. O sêmen descongelado foi submetido aos mesmos métodos de avaliação do sêmen fresco.

Os dados foram colocados em uma planilha do Excel® onde foram calculados as médias e o desvio padrão.

3.5 Resultados

Valores médios e desvios padrão das variáveis pré-congelamento: Concentração (250 \pm 135,34 x 10⁶ milhões/ml); HOST (63,09% \pm 14,02); Fluorescência (63,04% \pm 10,45); Motilidade Total (MT) (75,93% \pm 10,27); Motilidade Progressiva (MP) (53,71% \pm 18,38); Motilidade Rápida (MR) (13,78% \pm 10,38); Motilidade Lenta (ML) (32,43% \pm 13,37); Motilidade Local (MC) (22,43% \pm 10,17); Imóveis (IM) (23,24% \pm 10,89); VCL (116,88 μ m/s \pm 42,34); VSL (44,79 μ m/s \pm 17,72); VAP (56,40 μ m/s \pm 21,08) LIN (0,4 μ m/s \pm 0,09), BCF (3,9 μ m/s \pm 1,6), ALH (0,7 μ m/s \pm 0,6) (Fig. 8, 9, 10, 11).

Valores médios e desvios padrão das variáveis pós-congelamento: HOST (42,73% \pm 7,06); Fluorescência (48,06% \pm 8,99); MT (52,85% \pm 7,27); MP (31,15% \pm 10,21); MR (4,78% \pm 5,37); ML (24,89% \pm 8,17); MC (22,44% \pm 8,68); IM (45,04% \pm 8,86); VCL (97,67 μ m/s \pm 35,25); VSL (35,33 μ m/s \pm 15,29); VAP (44,99 μ m/s \pm 17,98) LIN (0,3 μ m/s \pm 0,15), BCF (2,5 μ m/s \pm 1,7), ALH (0,35 μ m/s \pm 0,3) (Fig. 8, 9, 10, 11).

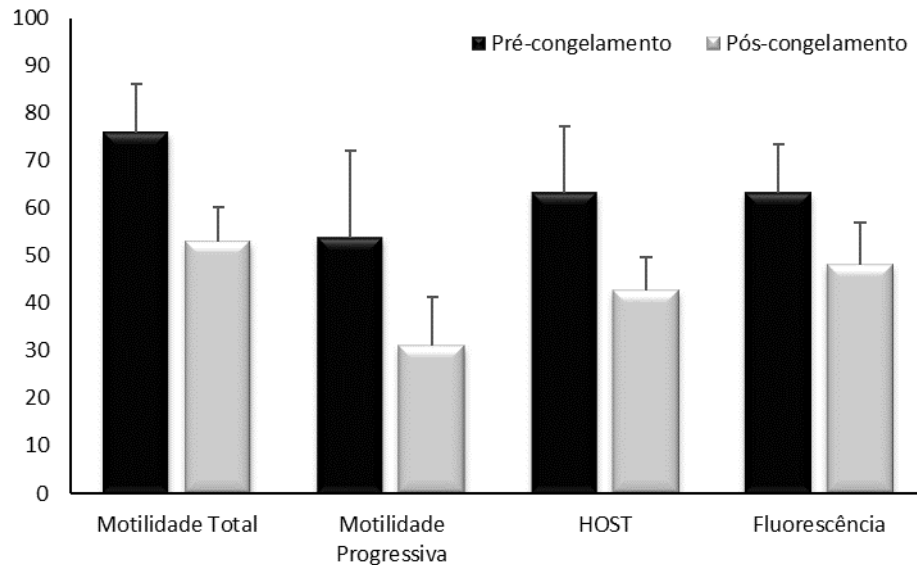


Fig. 8 Médias (% \pm DP) dos resultados da análise de cinética espermática, teste hiposmótico (HOST) e integridade de membrana plasmática (Fluorescência).

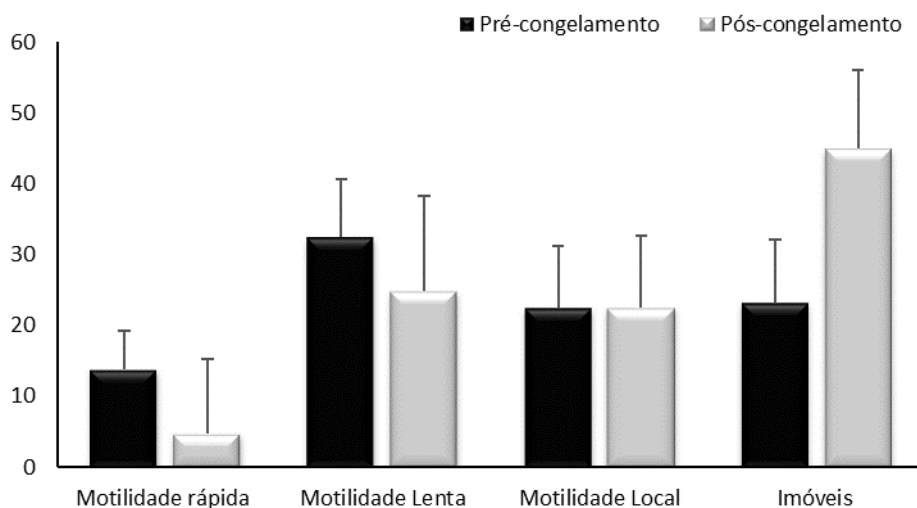


Fig. 9 Médias (% \pm DP) dos resultados da análise de cinética espermática através do sistema CASA.

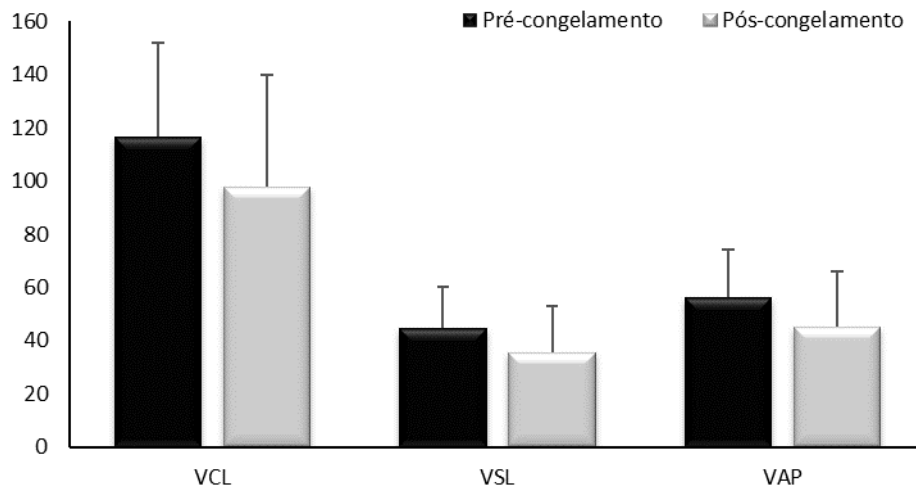


Fig. 10 Médias ($\mu\text{m/s} \pm \text{DP}$) dos resultados da análise de cinética espermática através do sistema CASA. Velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média da trajetória (VAP).

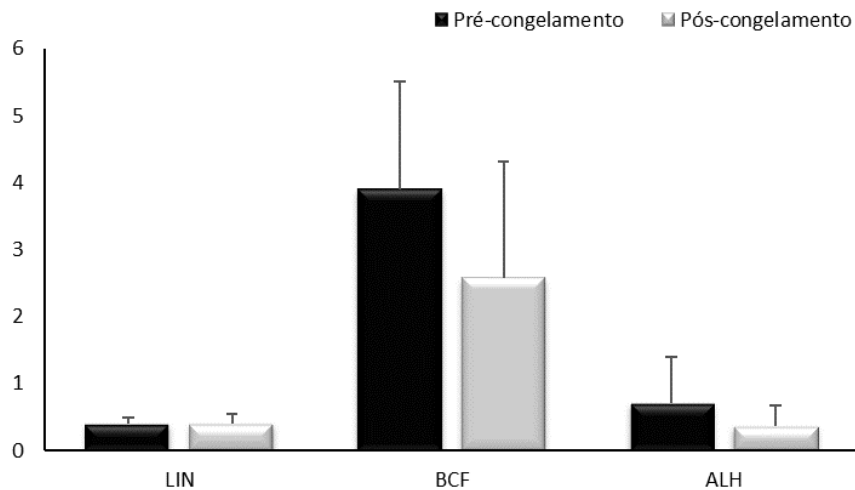


Fig. 11 Médias ($\mu\text{m/s} \pm \text{DP}$) dos resultados da análise de cinética espermática através do sistema CASA. Linearidade (LIN), frequência de batimento do flagelo (BCF), deslocamento lateral da cabeça (ALH).

3.6 Discussão

A criopreservação de sêmen é fortemente creditada sob a óptica de que a chave para o sucesso da técnica é o próprio ganhão (SIEME, 2011a). Porém o sucesso é dependente de uma série complexa de interações, envolvendo fatores intrínsecos do ganhão, constituição da membrana do espermatozoide, natureza do diluente e processamento adequado da amostra.

A realização do congelamento de ejaculados que apresentavam motilidade total $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 a fresco, como descrito pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998; 2013), possibilitou à pesquisa que o efeito individual do ganhão fosse descartado. Da mesma forma, o sêmen descongelado deve apresentar motilidade total $\geq 30\%$ e vigor ≥ 3 . A motilidade total pós congelamento é o parâmetro mais utilizado para selecionar ejaculados após o descongelamento (VIDAMENT *et al.*, 1998), sendo os resultados encontrados para motilidade total adequados aos parâmetros pré-estabelecidos.

Os resultados de motilidade total pós descongelamento MT ($52,85\% \pm 7,27$), com mesmo diluidor, foram superiores ao encontrado por Candeias *et al.* (2012) ($41,39\% \pm 16,83$) na raça Mangalarga Marchador e inferiores ao encontrado por Maziero *et al.* (2019) ($68,5\% \pm 4,5$) em ganhões da raça Brasileiro de Hipismo. Os parâmetros iniciais da presente pesquisa coincidiram com os valores de motilidade e vigor do sêmen fresco dos estudos de Candeias *et al.* (2012) e Maziero *et al.* (2019), já a motilidade progressiva MP ($31,15\% \pm 10,21$) foi superior ao encontrado nas duas raças ($19,37\% \pm 12,10$) e ($26,9\% \pm 3,3$), respectivamente. Os resultados de VAP, VSL e VCL foram menores do que o encontrado por Maziero (2019).

O teste de integridade de membrana pós-descongelamento ($48,06\% \pm 8,99$) demonstrou-se superior ao encontrados por Maziero (2019) (32,2%). Os resultados encontrados neste estudo para o HOST ($42,73\% \pm 7,06$), foram superiores aos encontrados por Hernández-Avilés *et al.* (2018) avaliando cinco diferentes diluentes de congelamento em ganhões da raça Passo Fino Colombianos.

3.7 Conclusão

Desde que a inseminação artificial foi liberada pela Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC), em 2011, a propagação de genética superior da raça segue crescente. E a utilização de sêmen congelado contribui de forma direta com esse avanço, já que o acesso ao uso de importantes garanhões ficou mais fácil para criatórios de diferentes regiões do Brasil e, inclusive, de outros países.

Concluimos que o protocolo e o diluente utilizado para a criopreservação é viável para utilização no sêmen de cavalos da raça Crioula, seguindo a recomendação mínima dos parâmetros seminais pós-congelamento do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso da criopreservação depende de uma série complexa de interações, envolvendo fatores intrínsecos do garanhão, constituição da membrana do espermatozoide, natureza do diluente e temperatura final de armazenamento. O crescimento da criação de equinos da raça Crioula é evidente e se deve, em parte, ao desenvolvimento e utilização de biotecnologias de reprodução, como o uso de técnicas adequadas para a preservação e o armazenamento de sêmen. Podemos assim concluir que o protocolo utilizado para a criopreservação é viável para utilização no sêmen de cavalos da raça Crioula, seguindo a recomendação mínima dos parâmetros seminais pós-congelamento do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

REFERÊNCIAS

ABCCC. **Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Crioulo** (2019). Disponível em <http://www.cavalocrioulo.org.br/studbook/cavalo_crioulo>. Acesso: junho de 2019

ALGHAMDI, A. S. et al. Effect of seminal plasma concentration and various extenders on postthaw motility and glass wool-Sephadex filtration of cryopreserved stallion semen. **American journal of veterinary research**, v. 63, n. 6, p. 880-885, 2002

ALVARENGA, M. A.; LEÃO, K. M. Hysteroscopic insemination of mares with low number of frozen thawed spermatozoa selected by percoll gradient. **Theriogenology**, p. 651-653, 2002.

AMANN, R, P. Physiology and Endocrinology. *In: McKINNON, A.O. et al. Equine reproduction*. John Wiley & Sons, 2011. 881-908 p.

AMANN, R, P; GRAHAM, J, K. Spermatozoal Function. *In: McKINNON, A.O. et al. Equine reproduction*. John Wiley & Sons, 2011. 1053-1084 p.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. *In: McKINNON, A.O. et al. Equine reproduction*. Philadelphia: Lea and Febiger, v. 7, 1993, p. 15-745.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of equine veterinary science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

ANIMAL, Colégio Brasileiro de Reprodução. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 1 ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.

ARGO CM, COX JE, GRAY JL: Effect of oral melatonin treatment on the seasonal physiology of pony stallions. **Journal of reproduction and fertility** 44:115, 1991.

AURICH, C. et al. Effects of the opioid antagonist naloxone on release of luteinizing hormone in mares during the anovulatory season. **Journal of endocrinology**, v. 142, n. 1, p. 139-144, 1994.

AURICH, C; Semen Extenders for Cooled Semen (Europe). *In: McKINNON, A.O. et al. Equine reproduction*. John Wiley & Sons, 2011. 1336 - 1340p.

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.

BATELLIER, F. et al. Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, n. 3, p. 391-410, 1997.

BEDFORD-GUAUS, S. J.; MCPARTLIN, L. A.; VARNER, D. D. Characterization of equine phospholipase C zeta: a review and preliminary results on expression defects in subfertile stallions. **Journal of equine veterinary science**, v. 32, n. 8, p. 445-450, 2012.

BRAUN, J. et al. Preservation of ejaculated and epididymal stallion spermatozoa by cooling and freezing. **Theriogenology**, v. 41, n. 4, p. 809-818, 1994.

BREIER, B. H. et al. Therapy with growth hormone: major prospects for the treatment of male subfertility? **Endocrine journal**, v. 45, n. Suppl, p. S53-S60, 1998.

BRINSKO, S. P. et al. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, n. 8, p. 1641-1655, 2000.

BRINSKO, S. P. Semen Preservation. *In: Manual of equine reproduction/Equine reproduction*. 2011. 213-233 p

BRITO, L. FC. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 249-264, 2007.

BUENO, V, C. L et al. The Role of PLC ζ and WPB2NL Gene Expression in Semen Quality and Fertility of Stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 66, p. 33, 2018.

CANDEIAS, M. L. et al. Semen cryopreservation protocols of Mangalarga Marchador stallions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 9, p. 1989-1995, 2012.

CHOWDHARY, B. P.; PARIA, N.; RAUDSEPP, T. Potential applications of equine genomics in dissecting diseases and fertility. **Animal reproduction science**, v. 107, n. 3-4, p. 208-218, 2008.

CLAY, C. M. et al. Influences of season and artificial photoperiod on stallions: luteinizing hormone follicle-stimulating hormone and testosterone. **Journal of animal science**, v. 66, n. 5, p. 1246-1255, 1988.

CLULOW, J. R. et al. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. **Animal reproduction science**, v. 108, n. 3-4, p. 298-308, 2008.

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

COOKE, P. S. et al. Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 194, n. 3, p. 309-335, 2004.

CUMMINGS, J. M.; WOODALL, P. F. On mammalian sperm dimension. **Journal of reproduction and fertility**, v. 75, p. 153-175, 198 5.

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

DOUGLAS R.H.; UMPHENOUR N: Endocrine abnormalities and hormonal therapy. **Vet Clin North Am Equine Pract** 8:237, 1992

FERREIRA, S. Aquaporinas. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 2, 2014.

Food and Agriculture Organization – FAO United Nations (2016). Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>>. Acesso: junho de 2019

GARNER, D. L. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, n. 1, p. 127-138, 1986.

GERLACH, T.; AURICH, J. E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. **Animal reproduction science**, v. 58, n. 3-4, p. 197-213, 2000.

GILMORE, J. A. et al. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biology of reproduction**, v. 53, n. 5, p. 985-995, 1995.

GRAHAM, E. F.; SCHMEHL, M. L.; DEYO, R. C. M. Cryopreservation and fertility of fish, poultry and mammalian spermatozoa. In: **Proceedings of the 10th NAAB Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction**. National Association of Animal Breeders, WI, Columbia, MO, 1984. p. 4-24.

GRAHAM, J. K. Principles of cooled semen. MCKINNON, A.O; SQUIRES, E.L; **Equine Reproduction**. Publishing Ltda, v. 1, p. 1308-1315, 2011(a)

GRAHAM, J.K; Principles of Cryopreservation. In: MCKINNON, A.O. *et al.* **Equine reproduction**. John Wiley & Sons, 2959 - 2963p. 2011(b).

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

HERNÁNDEZ-AVILÉS, C. *et al.* Evaluation of Post-Thaw Sperm Function and Integrity Parameters Under Different Freezing Regimens in Colombian Paso Fino Stallions. **Journal of equine veterinary science**, v. 67, p. 7-14, 2018.

HONDO, E. et al. Prolactin receptor expression in rat spermatogenic cells. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 6, p. 1284-1290, 1995.

IRVINE, C. H. G.; ALEXANDER, S. L. A novel technique for measuring hypothalamic and pituitary hormone secretion rates from collection of pituitary venous effluent in the normal horse. **Journal of endocrinology**, v. 113, n. 2, p. 183-192, 1987.

JASKO, D. J. et al. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v. 35, n. 6, p. 1059-1067, 1991.

JOHNSON, L; GRIFFIN, C, E; MARTIN, M, T. Spermatogenesis. In: MCKINNON, A.O. *et al.* **Equine reproduction**. John Wiley & Sons, 2011. 1026-1052 p.

JOHNSON, L. Spermatogenesis and aging in the human. **Journal of andrology**, v. 7, n. 6, p. 331-354, 1986.

JOHNSON, L.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Scanning electron and light microscopy of the equine seminiferous tubule. **Fertility and sterility**, v. 29, n. 2, p. 208-215, 1978.

KARASEK, M. et al. Circadian variations in plasma melatonin, FSH, LH, and prolactin and testosterone levels in infertile men. **Journal of pineal research**, v. 9, n. 2, p. 149-157, 1990.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal reproduction science**, v. 107, n. 3-4, p. 249-256, 2008.

KENNEY, R. M. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. **Proc. Am. Assoc. Equine Practitioners**, p. 327-336, 1975.

KOSINIAK, K. Characteristics of the successive jets of ejaculated semen of stallions. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 23, p. 59-61, 1975.

LAGARES, M. A. *et al.* Preservação do sêmen fresco equino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. **Arquivos Faculdade Veterinária da UFRGS**, v.26, n. 1, p.29-42, 1998.

LANGLAIS, J.; ROBERTS, K. D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete research**, v. 12, n. 2, p. 183-224, 1985.

LANGLAIS, J.; ROBERTS, K. D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete research**, v. 12, n. 2, p. 183-224, 1985

LEBOEUF, B. et al. Effect of native phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 867-877, 2003.

LEON, P. M. M. et al. Expression of apoptotic genes in immature and in vitro matured equine oocytes and cumulus cells. **Zygote**, v. 21, n. 3, p. 279-285, 2013.

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal reproduction science**, v. 105, n. 1-2, p. 119-128, 2008.

LUSIGNAN, M. et al. The major proteins of bovine seminal plasma interact with caseins and whey proteins of milk extender. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 3, p. 457-464, 2011.

MAGISTRINI, M. et al. Biophysical and 1H magnetic resonance spectroscopy characteristics of fractionated stallion ejaculates. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 56, p. 101-110, 2000.

MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. Testis and Testicular Semen. *In: Male Reproductive Function and Semen*. Springer, London, 1981. p. 83-130.

MARAN, R. R. M. Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. **Archives of Andrology**, v. 49, n. 5, p. 375-388, 2003.

MATSUMOTO A: Hormonal control of spermatogenesis. In Burger H, de Kretser D, eds: **The Testis**. 2nd ed., New York: Raven Press, 1989, pp 181-196.

MAZIERO, R. R. D. *et al.* Effect of Using Two Cryopreservation Methods on Viability and Fertility of Frozen Stallion Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 72, p. 37-40, 2019.

MENDIS-HANDAGAMA, C.; ARIYARATNE, S. Prolonged and transient neonatal hypothyroidism on Leydig cell differentiation in the postnatal rat testis. **Archives of andrology**, v. 50, n. 5, p. 347-357, 2004.

MERYMAN, H. T. Cryopreservation of living cells: principles and practice. **Transfusion**, v. 47, n. 5, p. 935-945, 2007.

METCALF, E. S. Pregnancy rates with cooled equine semen received in private practice. *In: Proceedings of the 44th Annual Convention of American Association on Equine Practice*. Baltimore, Maryland. 1998. p. 16-18.

MEYERS, S, A. Sperm Physiology. *In: SAMPER J. C. Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Elsevier Health Sciences, 2009. 54-62 p.

MILLER, C. D. Optimizing the use of frozen–thawed equine semen. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 463-468, 2008.

MORAN, D. M. *et al.* Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, n. 6, p. 999-1012, 1992.

PESCH, S.; HOFFMANN, B. Cryopreservation of spermatozoa in veterinary medicine. **Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology**, v. 4, n. 2, p. 101-105, 2007

PICKETT, B. W. Seminal extenders and cooled semen. *In: McKINNON, A.O. et al. Equine reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 746-754, 1993.

PICKETT, B. W. Management of the Stallion for Maximum Reproductive Efficiency, II. **Colorado State University, Animal Reproduction Laboratory Bulletin**, p. 103-120, 1989.

- PLANTE, G. *et al.* Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins. **Cell and tissue research**, v. 363, n. 1, p. 105-127, 2016.
- RIGBY, S. L. *et al.* Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. **Animal reproduction science**, v. 68, n. 3-4, p. 171-180, 2001.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. *et al.* Seminal plasma proteins: what role do they play?. **American journal of reproductive immunology**, v. 66, p. 11-22, 2011.
- ROSER, J. F.; Reproductive Endocrinology of the Stallion. *In*: SAMPER J. C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Elsevier Health Sciences, 2008. 17-31 p.
- SAMPER, J. C.; MORRIS, C. A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 895-903, 1998.
- SAMPER, J. C.; MORRIS, C. A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 895-903, 1998.
- SAMPER, J.C. Breeding with Cooled Transported Semen. *In*: McKINNON, A.O. *et al.* **Equine reproduction**. John Wiley & Sons, 2011. 1316 - 1322p.
- SHARP D. C, CLEAVER B. D: Melatonin. *In* Mckinnon AO, Voss JL, eds: *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, pp 100-108.
- SIEME, H. Freezing Semen. *In*: McKINNON, A.O. *et al.* **Equine reproduction**. John Wiley & Sons, 2011a. 2972-2982p.
- SIEME, H. Semen Extenders for Frozen Semen. *In*: McKINNON, A.O. *et al.* **Equine reproduction**. John Wiley & Sons, 2011b. 2964-2971p.
- SIEME, H; DISTL, O. Genomics and fertility in stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 467-470, 2012.
- SILBERZAHN, P. *et al.* Testosterone response to human chorionic gonadotropin injection in the stallion. **Equine veterinary journal**, v. 20, n. 1, p. 61-63, 1988
- SINGER, S. J; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.
- SPITERI-GRECH, J.; NIESCHLAG, E. The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 38, n. Suppl. 1, p. 22-27, 1992.
- SQUIRES, E. L.; KEITH, S. L.; GRAHAM, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1056-1065, 2004.
- SWIERSTRA, E. E.; GEBAUER, M. R.; PICKETT, B. W. Reproductive physiology of the stallion. **Reproduction**, v. 40, n. 1, p. 113-123, 1974.

- TILBROOK, A. J.; CLARKE, I. J. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 3, p. 735-742, 2001.
- TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, n. 27, p. 53-59, 1979
- VARNER, D.D.; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View: Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. In: MCKINNON, A.O. *et al.* **Equine reproduction**. John Wiley & Sons, 2011. 909-990 p.
- VARNER, Dickson D. *et al.* Semen processing for the subfertile stallion. **Journal of equine veterinary science**, v. 28, n. 11, p. 677-685, 2008.
- VERKMAN, A. S. Aquaporins at a glance. **J Cell Sci**, v. 124, n. 13, p. 2107-2112, 2011.
- VIDAMENT, M. *et al.* Evaluation of stallion semen before and after freezing. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 33, n. 3-4, p. 271-277, 1998.
- WATSON, P. F. Effects of cold shock on sperm cell membranes. **Effects of low temperatures on biological membranes**, 1981a
- 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, n. 4, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 C by egg-yolk lipoprotein. **Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 483-492, 1981b.
- WEBER, J. A.; WOODS, G. L. Ultrasonographic measurement of stallion accessory sex glands and excurrent ducts during seminal emission and ejaculation. **Biology of reproduction**, v. 49, n. 2, p. 267-273, 1993.

APÊNDICE A – XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, realizado em Gramado, RS, de 15 a 17 de maio de 2019

Características seminais pós-congelamento em garanhões da raça Crioula

Post-thaw seminal characteristics of Criollo breed stallions

Leonardo Glaeser Paul^{1,*}, Verônica La Cruz Bueno^{1,2}, Henrique Boll de Araujo Bastos¹, Gustavo Rupp Larentis¹, Luiz Augusto Machado Centeno¹, Rodrigo Costa Mattos^{1,2}, Sandra Fiala Rechsteiner^{1,2}

¹REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brasil;²HISTOREP - Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas-RS, Brasil;

*E-mail: leopaul16@hotmail.com

A raça Crioula, acompanhando o forte crescimento da equinocultura no Brasil, apresentou importante evolução nos últimos anos. Após quase 90 anos de história, conforme dados da Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos, são mais de 400 mil exemplares registrados. A inseminação artificial (IA) é uma ferramenta para acelerar o ganho genético e competitividade na indústria equestre. O uso da IA com sêmen congelado, além de possibilitar a conservação e utilização do material genético de reprodutores por tempo indeterminado, favorece a sua difusão, oportunizando a maximização do potencial genético de garanhões zootecnicamente superiores. Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade do sêmen de garanhões da Raça Crioula após o processo de criopreservação. Foram utilizados ejaculados de 24 garanhões da raça Crioula, localizados próximo a Porto Alegre (30°S, 51°W), RS, Brasil. As análises microscópicas foram realizadas pré e pós-congelamento através do sistema Computer Assisted Sperm Analysis AndroVision®. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer. A análise da integridade física da membrana foi realizada utilizando-se sondas fluorescentes (CFDA/PI). A funcionalidade da membrana plasmática foi avaliada por meio do teste hiposmótico (HOST). Somente foram utilizadas amostras com motilidade total $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 . As amostras foram centrifugadas a 600 xg por 10 minutos e osobrenadante foi removido. O *pellet* formado foi ressuscitado em um diluente comercial próprio para congelamento a base de gema de ovo, glicerol e dimetilformamida, previamente aquecido a 37°C até a concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL. As amostras foram então envasadas em palhetas de 0,5 ml e refrigeradas a 5°C por 20 minutos em refrigerador comercial, expostas ao vapor de nitrogênio durante 20 minutos, sendo finalmente imersas no nitrogênio líquido. Valores médios e desvios padrão das variáveis do sêmen fresco: Concentração (250×10^6 milhões/ml $\pm 135,34$); HOST ($63,09 \pm 14,02$); Fluorescência ($63,04 \pm 10,45$); Motilidade Total (MT)($75,93 \pm 10,27$); Motilidade Progressiva (MP) ($53,71 \pm 18,38$); Motilidade Rápida (MR)($13,78 \pm 10,38$); Motilidade Lenta (ML)($32,43 \pm 13,37$); Motilidade Local (MC)($22,43 \pm 10,17$); Imóveis (IM)($23,24 \pm 10,89$); VCL ($116,88 \pm 42,34$); VSL($44,79 \pm 17,72$); VAP ($56,40 \pm 21,08$). Valores médios e desvios padrão das variáveis pós-congelamento: HOST ($42,73 \pm 7,06$); Fluorescência ($48,06 \pm 8,99$); MT ($52,85 \pm 7,27$); MP ($31,15 \pm 10,21$); MR ($4,78 \pm 5,37$); ML ($24,89 \pm 8,17$); MC ($22,44 \pm 8,68$); IM ($45,04 \pm 8,86$); VCL ($97,67 \pm 35,25$); VSL ($35,33 \pm 15,29$); VAP ($44,99 \pm 17,98$). O sucesso da criopreservação depende de uma série complexa de interações, envolvendo fatores intrínsecos do garanhão, constituição da membrana do espermatozoide, natureza do diluente e temperatura final de armazenamento. O crescimento da criação de equinos da raça Crioula é evidente e se deve, em parte, ao desenvolvimento e utilização de biotecnologias de reprodução, como o uso de técnicas adequadas para a preservação e o armazenamento de sêmen. Podemos assim concluir que o protocolo utilizado para a criopreservação é viável para utilização no sêmen de cavalos da raça Crioula, seguindo a recomendação mínima dos parâmetros seminais pós-congelamento do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal.

Palavras chaves: criopreservação, sêmen, espermatozoides, fertilidade, equino.

Keywords: cryopreservation, semen, sperm cells, fertility, equine.

ANEXO A – CONVITE PARA PUBLICAÇÃO

17/06/2019

Email – Leonardo Paul – Outlook

XXIII CBRA_convite RBRA

RBRA <rbra@cbra.org.br>

Sex, 07/06/2019 10:10

Para: leopaul16@hotmail.com <leopaul16@hotmail.com>

249 - Características seminais pós-congelamento em garanhões da raça Crioula - Paul LG; La Cruz Bueno V; Bastos HBA; Larentis GR; Centeno LAM; Mattos RC; Rechsteiner SF

Prezado (as) Autor (as),

Cordiais Saudações!

Conforme avaliação e indicação pelo Comitê Científico do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA 2019), os Editores da Revista Brasileira (RBRA), gostariam de convidá-lo(a), para submeter o seu trabalho apresentado na forma de poster como artigo na íntegra. O objetivo da Revista Brasileira de Reprodução Animal e a publicação de artigos científicos, revisões (minirevisões, levantamentos bibliográficos), comunicações e relatos de casos, capazes de contribuir, significativamente, para um melhor conhecimento dos fenômenos ligados à reprodução animal, bem como para a divulgação da produção científica da área.

A revista é publicada exclusivamente em versão eletrônica e editada trimestralmente pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. O acesso à "Revista Brasileira de Reprodução Animal" na sua versão eletrônica é livre.

Assim sendo, estando de acordo pedimos a gentileza de enviar sua resposta o mais breve possível.

Os Editores parabenizam os autores pela apresentação.

Qualquer dúvida estamos a disposição.

Atenciosamente,

Dr. Marcelo Rezende Luz
Editor da Revista Brasileira de Reprodução Animal
Presidente do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA (2019-2023)