

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO ENVASADO EM CRIOTUBO

Sabrina Leães Gomez Lorenzoni

PORTO ALEGRE, AGOSTO DE 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO ENVASADO EM CRIOTUBO

Autor: Sabrina Leães Gomez Lorenzoni

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Biotécnicas da Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Rodrigues

PORTO ALEGRE

2010

CIP - Catalogação na Publicação

Lorenzoni, Sabrina Leães Gomez
Criopreservação de sêmen equino envasado em
criotubo / Sabrina Leães Gomez Lorenzoni. -- 2010.
65 f.

Orientador: José Luiz Rodrigues.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Criopreservação. 2. Sêmen. 3. Equino. 4.
Criotubo. I. Rodrigues, José Luiz, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sabrina Leães Gomez Lorenzoni

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO ENVASADO EM CRIOTUBO

APROVADA POR:

Prof. Dr. José Luiz Rodrigues
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Alves Pimentel
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Malschitsky
Membro da Comissão

Prof. Dr. Alexandre Duarte Tavares
Membro da Comissão

Aos potros que nasceram deste experimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu marido Diego, pela compreensão, auxílio logístico e afetivo, e companheirismo durante esta caminhada. À minha família pelo apoio e palavras de incentivo.

Ao Professor Dr Rodrigues pelos ensinamentos que jamais esquecerei.

Aos colegas e funcionários do laboratório pelo companheirismo e auxílio, em especial ao Sr João e à Natalia Arruda.

À amiga e colega Andrea Galuppo pela amizade e carinho.

Ao Dr Leo, proprietário do Haras Warszawsky pela infraestrutura, pelos animais e materiais cedidos.

Ao Diretor da Coudelaria de Rincão, Organização Militar do Exército Brasileiro, Coronel de Cavalaria Marco Antonio Fantini Silva, pela confiança, instalações e animais. Ao chefe da Seção Veterinária desta Organização Militar, Capitão Rafael Rodrigues, colega de profissão e de farda, pela dedicação e apoio na realização dos experimentos.

Ao Dr. Paulo e à Dra Jane pelos valiosos conselhos que foram fundamentais para a transposição dos obstáculos.

E finalmente agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a elaboração deste trabalho.

"O justo tem consideração pela vida dos seus animais." (Provérbios 12:10)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados da avaliação seminal dos reprodutores realizada imediatamente após a coleta.....	32
Tabela 2: Avaliação da motilidade e vigor espermáticos pós descongelamento, referente aos Garanhões A, B e C, comparando o método de congelamento e o diluente.....	33
Tabela 3: Avaliação da motilidade e vigor espermáticos pós descongelamento das amostras de sêmen envasadas em palhetas ou criotubos.....	33

RESUMO

Na espécie equina, ao contrário do obtido com ruminantes, as técnicas de criopreservação de sêmen progridem lentamente, mas apesar das barreiras técnicas o emprego da inseminação artificial com sêmen congelado vem crescendo. Este experimento foi dividido em três etapas: na primeira comparou-se a utilização de diferentes diluentes e técnicas de congelação; determinação da eficiência do criotubo para envase do sêmen para a criopreservação; e na terceira determinou-se as taxas de prenhez das éguas artificialmente inseminadas com sêmen congelado envasado em criotubo. Seis garanhões foram submetidos à coleta do sêmen e doze éguas foram inseminadas artificialmente no primeiro estro da estação reprodutiva. As amostras foram diluídas em INRA82 ou Nagase, contendo 5% de glicerol, com concentração de 200×10^6 espermatozoides/ml. Parte do sêmen diluído foi envasado em palhetas (0,5ml), das quais uma parte foi imediatamente congelada. As palhetas restantes foram resfriadas previamente da temperatura ambiente (24°C) até 5°C antes do congelamento. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30seg. O mesmo protocolo de congelamento com resfriamento prévio foi realizado com as amostras envasadas em criotubos, sendo estas amostras descongeladas a 50°C por 100seg em banho-maria. A eficiência *in vivo* do sêmen criopreservado, foi determinada através da inseminação artificial. O diagnóstico de prenhez foi realizado 20 dias após a inseminação artificial através de exame ultrassonográfico. Após a análise dos dados verificou-se que não houve diferença significativa entre os diluentes testados na motilidade progressiva e vigor dos espermatozoides. As médias da motilidade espermática após o aquecimento das amostras foram de: 43,32% e 26,66%, para o sêmen diluído com INRA82 submetido ao resfriamento ou não antes do congelamento, respectivamente, e para o sêmen diluído com Nagase revelou motilidade espermática de 41,08% e 24,44%, respectivamente. De acordo com esses resultados, os grupos experimentais submetidos ao resfriamento prévio apresentaram taxas de motilidade espermática superiores aos grupos que foram congelados diretamente. Não se verificou diferenças quanto ao vigor, motilidade e defeitos espermáticos entre os diluentes testados e os tipos de envase. As éguas inseminadas com criotubo apresentaram taxa de prenhez de 50% (3/6), já com as éguas do grupo controle (palheta) observou-se 16,66% (1/6), provando a viabilidade do congelamento do sêmen envasado em criotubo.

ABSTRACT

In the horse industry, unlike obtained with cattle, the development of sperm cryopreservation techniques are very slow but despite the technical barriers the artificial insemination with frozen semen is growing. This experiment was divided into three steps. The first one compared the use of different diluents and freezing techniques. The other two stages were the use of cryogenic tubes for filling the semen and the determination of mare pregnancy rates that were artificially inseminated with frozen semen packaged in cryogenic tubes. Six stallions were submitted to semen collection and twelve mares were artificially inseminated at first estrus of the breeding season. The samples were diluted in INRA82 or Nagase, containing 5% glycerol, with a concentration of 200×10^6 sperm / ml. A fraction of the diluted semen was stored in straws (0.5 ml), some of those straws were immediately frozen. The remaining straws were cooled from room temperature (24°C) to 5° C before freezing. The samples were thawed in a water bath at 37° C during 30sec. The same protocol with cooling prior to freezing was performed with samples filled into cryogenic tubes, and these samples were thawed in a water bath at 50° C during 100seg. The in vivo efficiency of cryopreserved semen was determined through artificial insemination. The diagnosis of pregnancy was performed after 20 days by ultrasound examination. After analyzing the data it was found that there was no significant difference in sperm motility and vigor among the tested diluents. Motility was INRA82: 43.32% / 26.66% and Nagase: 41.08% / 24.44%, when the semen was previously cooled or frozen directly, respectively. According to these results, the experimental groups subjected to cooling prior freezing showed better motility rates than the groups that were frozen directly. There were no differences regarding the vigor, motility and sperm defects among the diluents and the semen containers. The mares inseminated with cryotubes showed 50% (3/6) pregnancy rate, and 16.66% (1/6) pregnancy rate was observed in the group of mares inseminated with straws.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Criopreservação de sêmen.....	13
2.2	Crioprotetores.....	15
2.3	Envase do sêmen criopreservado.....	19
2.4	Avaliação do sêmen criopreservado.....	20
2.5	Inseminação artificial.....	22
3	ARTIGO: CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO ENVASADO EM CRIOTUBO.....	25
	RESUMO.....	25
	ABSTRACT.....	26
3.3	Introdução.....	27
3.4	Materiais e Métodos.....	28
3.5	Resultados.....	31

3.6	Discussão.....	33
3.7	Conclusões.....	36
	REFERÊNCIAS	37
4	Considerações finais e perspectivas.....	41
	REFERÊNCIAS.....	43
	APÊNDICES.....	52
	ANEXOS.....	63

1 INTRODUÇÃO

A equinocultura evoluiu através dos tempos e passou de uma relação com homem inteiramente voltada ao trabalho e transporte, a uma atividade esportiva e multidisciplinar.

Atualmente o uso de biotecnologias que empregam os gametas femininos e masculinos tornam-se instrumento importante nos programas de reprodução assistida. O avanço dos processos de criopreservação possibilitou a preservação e armazenamento de células, tecidos e embriões. O desenvolvimento destas técnicas tem sido uma ferramenta importante no processo de seleção genética nas espécies de produção, assim como seguro biológico para aqueles animais ameaçados de extinção.

Smith e Polge (1950) foram os primeiros a relatarem o procedimento de congelamento de sêmen equino, no qual observaram a sobrevivência de espermatozoides separados do plasma seminal e ressuspensos em soluções tamponadas contendo glicerol e glicose. Posteriormente, Barker e Gandier (1957) relataram a primeira prenhez de uma égua após sete inseminações artificiais, com espermatozoides colhidos do epidídimo de garanhões, diluídos em leite contendo 10% de glicerol e congelados. Na década de 60, os pesquisadores japoneses Nagase e Niwa (1964) obtiveram sucesso no congelamento e armazenamento de sêmen, técnica essa que foi introduzida comercialmente na década de 70. Segundo Mies Filho (1977) as primeiras inseminações no Brasil ocorreram nos anos de 1931 e 1932, na Coudelaria do Exército Brasileiro, no Rio Grande do Sul. Porém, a mecanização dos sistemas de transportes, assim como a proibição do uso da inseminação artificial por algumas associações de raça, impediram que as técnicas de reprodução assistida se desenvolvessem nesta espécie, da mesma forma que ocorreu em outras espécies destinadas à alimentação humana.

O emprego do sêmen equino congelado aumentou como consequência da redução dos danos sofridos pelos espermatozoides durante o congelamento e descongelamento (VIDAMENT et al., 2001). Segundo Graham (1996) a criopreservação do sêmen viabiliza a utilização de garanhões geneticamente superiores, provenientes de diversas localidades, sem os gastos inerentes ao

transporte tanto do macho como da fêmea, além de possibilitar o aumento do número de animais a serem acasalados com um determinado reprodutor. De acordo com Papa et al. (2005) o desenvolvimento de técnicas para a preservação e armazenamento de sêmen é um dos passos de maior importância, uma vez que, possibilita o melhor aproveitamento de animais com interesse zootécnico, o armazenamento de material genético e o transporte seguro de sêmen. Além de viabilizar a possibilidade de armazenamento do sêmen por tempo ilimitado (BUSTAMANTE, 2006).

A inseminação artificial é uma técnica que está em expansão na espécie equina, já que otimiza a utilização do garanhão, reduz os riscos de acidentes e diminui a incidência de doenças venéreas. Porém na espécie equina os resultados do uso da criopreservação de sêmen na inseminação artificial ainda não é satisfatória, como ocorre na espécie bovina.

Atualmente existem várias técnicas de diluição, resfriamento e congelamento, que vêm sendo empregadas na espécie equina com diferentes taxas de sucesso (VIANNA, 2000). Desta forma, uma característica do processo de congelamento do sêmen equino é a ausência de padronização nos processos de criopreservação, desde o momento da coleta do ejaculado até a etapa de envase das amostras. Os objetivos do experimento foram determinar as taxas de motilidade e vigor espermáticos do sêmen imediatamente congelado ou previamente resfriado, diluído em INRA82 ou Nagase. Segundo, determinar as taxas de sobrevivência espermática de amostras diluídas em Nagase e envasadas em criotubo de 2ml. Terceiro, determinar a viabilidade de gerar gestações em éguas inseminadas com sêmen envasado em criotubo de 2ml, já que este tipo de envase não foi descrito ainda para inseminação artificial com sêmen criopreservado nesta espécie animal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Criopreservação de sêmen

Com o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida, a criobiologia passou a despertar grande interesse, e exercer um papel essencial (HOVATTA, 2003). Esta ciência trata da compreensão dos efeitos das baixas temperaturas sobre os sistemas celulares, já que o tempo biológico é uma consequência de determinadas reações bioquímicas e o frio prolonga esse tempo, pois diminui estas reações (ÁVILLA-PORTILLO et al., 2006).

A criopreservação tem como principal objetivo manter a integridade estrutural e a viabilidade celular após submeter as células a baixas temperaturas (CAVALCANTE et al., 2006)

A criopreservação do sêmen é dividida em diferentes etapas, iniciando-se com a coleta do sêmen, seguida pela sua diluição, centrifugação, resfriamento, passando pela desidratação celular, a congelação e finalmente a descongelação (MEDEIROS et. al. 2002). Cada etapa deve ser realizada com extremo cuidado e atenção, pois interfere diretamente no sucesso dos resultados obtidos com o uso da técnica (VIDAMENT et al., 2001). Considerando as diferentes etapas citadas acima nota-se que o processo de congelação de sêmen equino envolve inúmeros processos físicos e químicos, os quais estão relacionados à manutenção da integridade e viabilidade espermática, assim como com a fertilidade do sêmen congelado (GRAHAM, 1996).

Os danos causados às células durante os processos de congelamento e descongelamento se devem à formação de cristais de gelo intracelulares, que afetam a estrutura da célula, e à concentração de soluto resultante do processo de desidratação (OLIVEIRA, 2007).

Graham (1996) descreve que, segundo bases físico-químicas, a lesão celular, durante os processos de congelação e descongelação, é causada pela formação de cristais de gelo intracelulares que afetam a estrutura da célula, e pela concentração de soluto resultante da congelação da água pura, assim como da interação entre estes dois fatores. Squires et al. (1999) ao avaliarem a formação de cristais de gelo durante

o processo de congelamento de sêmen citam que a ocorrência de desidratação é um evento desejável, pois reduz a probabilidade de formação de cristais de gelo intracelulares que causariam danos às estruturas internas e/ou a membrana plasmática. Holt (2000) propõe que a exposição das células espermáticas a temperaturas abaixo das fisiológicas, mesmo antes de ocorrer o congelamento (processo de estabilização das células espermáticas), é responsável por mudanças na organização bi-dimensional dos lipídios da membrana, e também, alteração das propriedades de enzimas encontradas entre a membrana, diminuindo a viabilidade dos espermatozóides pós-descongelamento, através do adiantamento da capacitação espermática.

Loomis & Squires (2005) relataram os efeitos da criopreservação na membrana de espermatozóides, como perda da estabilidade da bicamada de lipídeos causada pela desidratação celular, alterações dos componentes da membrana celular, desnaturação de proteínas da membrana, além de alterações do metabolismo energético celular, lesões na membrana acrossomal, injúria oxidativa, danos ao DNA e cristalização dos solutos intracelulares levando a morte celular. Porém, nem todos os fosfolipídios da membrana tendem a formar a dupla camada, pois estes, geralmente estão associados às proteínas de membrana e possuem a função de eliminar possíveis poros que a dupla camada lipídica venha a formar (OLIVEIRA, 2007). Então, de acordo com este autor, diante de resfriamentos abruptos estes fosfolipídios deixam de interagir com as respectivas proteínas e também passam a assumir a conformação HEX II (Fase Hexagonal II), ao associarem-se entre si. Os autores salientam ainda que o descongelamento do sêmen expõe as células espermáticas às mesmas causas de estresse, porém em sentido inverso; inicialmente com a saída do crioprotetor e reidratação para o restabelecimento do equilíbrio osmótico.

De acordo com Oliveira (2007) diante do choque térmico, uma série de eventos pode ocorrer na membrana plasmática do espermatozóide equino, o que pode inviabilizar a célula para fecundação. Ocorre migração de proteínas de membrana, o que aumenta a aglomeração das mesmas na superfície da célula resultando na alteração da fluidez dos fosfolipídios da membrana plasmática durante o resfriamento, onde coexistem moléculas em domínios cristalinos e em domínios fluidos.

Durante o processo de criopreservação, o sêmen deve ser resfriado desde a temperatura corpórea (37°C) até a temperatura de 20°C, o que parece não ocasionar danos ao espermatozóide quando este se encontra diluído em meio adequado (KEITH, 1998). Segundo Squires et al. (1999) o estresse inicial ocorre quando o espermatozóide passa da temperatura de 20°C para 5°C, devido a fase de transição da membrana plasmática do estado líquido para a fase de gel (GRAHAM, 1996). Para que este efeito seja minimizado é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19°C e 8°C, utilizando-se curvas de resfriamento lentas, em torno de -0,05°C/min. (SQUIRES et al., 1999). A desidratação severa promove a desnaturação das macromoléculas ao mesmo tempo em que ocorre contração citoplasmática até o colapso da membrana (HOLT, 2000). Squires et al. (1999) propõem que o uso de curvas inadequadas de resfriamento pode promover alterações nos padrões normais de motilidade dos espermatozóides, assim como danos em seu metabolismo, na membrana plasmática e no acrossoma. Sendo assim, o uso de curvas de congelamento lentas pode minimizar estes danos (MELO, 2005).

Os procedimentos de criopreservação do sêmen equino, bem como de várias outras espécies, ainda não alcançaram um padrão que proporcione resultados satisfatórios de forma permanente, como ocorre na espécie bovina (WATSON, 2000).

De acordo com Oliveira (2007), a natureza exata dos danos causados pelo congelamento das células, ainda não está totalmente esclarecida.

2.2 Crioprotetores

No processo de criopreservação, é necessário o uso de substâncias crioprotetoras junto ao sêmen, para manutenção da viabilidade espermática, uma vez que eles protegem os espermatozóides dos danos causados pelo choque térmico, que é provocado pela formação de cristais de gelo, desidratação e posterior descongelamento (SNOECK, 2003; ARRUDA, 2000).

Os diluentes são compostos por substâncias para a manutenção da atividade metabólica dos espermatozóides, tem função de tampão, a fim de evitar alterações de pH, possuem antibióticos, para inibição do crescimento de bactérias durante o

período de armazenamento antes do uso e também, através dos crioprotetores, fornecem proteção contra o choque de temperatura durante o processo de congelamento (DIETZ et al., 2007).

A adição de diluentes ao sêmen visa proteger os espermatozóides de condições ambientais desfavoráveis, prolongarem sua sobrevivência (PICKETT e AMANN, 1987), bem como aumentar a viabilidade do sêmen de garanhões subfêrteis (BLANCHARD et al., 1987).

A presença de substâncias, como os crioprotetores no meio diluidor altera as propriedades físicas do processo de congelação da solução (VISKANTA et. al., 1997; WOLFE e BRYANT, 1999), assim como promove a proteção dos espermatozóides no processo de criopreservação (HOLT, 2000), reduzindo a formação de gelo intracelular (MEDEIROS et. al., 2002). Diluindo-se o sêmen há a prevenção de aglutinação espermática e a redução da influência de alterações no pH seminal (KENNEY et al., 1975). De acordo com Pickett et al., (1975) com a diluição do sêmen pretende-se ainda reduzir as perdas de espermatozóides no equipamento de inseminação, prolongar a viabilidade dos espermatozóides, incorporar antibiótico no sentido de reduzir o número de bactérias introduzidas no útero de éguas, e permitir o armazenamento e o transporte a longas distâncias.

Desta forma, Mattos (1995) demonstrou que o fator diluição leva a uma redução na concentração bacteriana no sêmen diluído em comparação ao sêmen “*in natura*”. Este fato, associado ao fracionamento do ejaculado e conseqüente diminuição do volume, faz com que o número de bactérias introduzidas no interior do útero, com inseminação artificial com sêmen diluído, seja menor que com a monta natural.

Embora os crioprotetores sejam fundamentais para a sobrevivência dos espermatozóides no processo de congelação, eles podem também, exercer efeitos tóxicos e diminuir as taxas de fertilidade quando presentes em altas concentrações (ROSSI et. al. 2003, WATSON, 2000), tais como, desnaturação de proteínas (ALVARENGA et al., 2005), aumento da viscosidade do citoplasma, efeito no balanço bioenergético (HAMMERSTED e GRAHAM, 1992) e estresse osmótico (GILMORE et al., 1995).

Diferentes diluidores já foram utilizados para resfriar, armazenar, transportar e congelar o sêmen de garanhões (PICKETT et al., 1975), e sua finalidade é favorecer a longevidade máxima das células espermáticas, embora se saiba que existem enorme

variação e imprevisibilidade de tolerância das células frente aos diluidores e técnicas de resfriamento e congelamento (VIANNA, 2000).

Estes componentes são classificados como penetrantes e não penetrantes ou intra e extracelulares (GRAHAM, 1996; ARRUDA, 2000).

Algumas substâncias, dentre as quais os lipídeos, proteínas e macromoléculas, são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelação, sem que para isso necessitem penetrar no espermatozóide, são estes a gema de ovo, leite, alguns açúcares e a albumina sérica bovina (KEITH, 1998).

Melo et al. (2005) sugerem que os diluentes à base de gema de ovo preservam melhor a membrana plasmática quando comparados aos diluentes à base de leite desnatado.

A gema de ovo é rotineiramente utilizada nos diluentes para criopreservação de sêmen de mamíferos. Acredita-se que sua ação seja devida à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais aderem à membrana celular durante o processo de congelação, preservando com isso, a membrana do espermatozóide (MOUSSA et. al. 2002) atuando na superfície da membrana plasmática, restaurando a perda de fosfolipídios e aparentemente induzindo a uma alteração transitória de sua composição, conseqüentemente prevenindo a ruptura da membrana plasmática (FARSTARD, 1996). A gema de ovo no meio diluente de criopreservação beneficia os espermatozóides por manter a pressão coloidal do meio e também pela presença de uma lipoproteína de baixa densidade, que estabiliza a membrana espermática durante a congelação e descongelação (FOULKES, 1977).

Holt (2000) revisou os aspectos relacionados à congelação de sêmen e relatou que os efeitos crioprotetores da gema do ovo estão envolvidos com a porção lipoprotéica de baixa densidade a qual protege as células espermáticas do choque térmico, da fase de transição dos lipídeos e danos a membrana plasmática a temperaturas abaixo do ponto de congelação da solução. Os diluentes usados na criopreservação de sêmen equino contêm entre 2 e 20% de gema de ovo.

Os açúcares, classificados também como crioprotetores não penetrantes, atuam através da pressão osmótica na desidratação celular, reduzindo a água passível de ser congelada no interior da célula de modo a reduzir a injúria causada pela cristalização (AISEN et. al., 2002). Além de atuarem como crioprotetores, alguns açúcares são substrato energético para o espermatozóide durante a incubação (YILDIZ et. al., 2000).

Os açúcares desempenham importantes papéis no meio diluente de congelação, atuando basicamente como substrato para a proteção de energia pelos espermatozóides, na manutenção da pressão osmótica do diluente, aumentando a quantidade de água não congelada em temperaturas abaixo do ponto de congelação da água e reduzindo a concentração de sais na solução não congelada (HOLT, 2000).

Já o leite, é empregado para diluir e armazenar o sêmen fresco ou resfriado. A eficiência dos meios diluentes à base de leite tem sido atribuída à sua composição protéica que atua como tampão e a propriedade quelante frente a metais pesados, havendo relatos de sua parcial proteção contra a redução da temperatura durante o processo de refrigeração (SALAMON & MAXWELL, 2000).

De acordo com Snoeck et al. (2007) a maioria dos diluentes possui em sua formulação açúcares, eletrólitos, leite, gema de ovo (concentração de 1,6 a 20%) e glicerol (2,5 a 5%). Outros crioprotetores também são descritos para a criopreservação de sêmen, tais como: etilenoglicol (ALVARENGA et al., 2000), dimetilsulfóxido (MELO, 2005) e dimetilformamida (ALVARENGA et al., 2005). Nos protocolos de congelação de sêmen equino, o crioprotetor mais usado é o glicerol (MARTIN et. al., 1979; LOOMIS et. al., 1983; CONCHAN et al., 1984; PAPA, 1987; GRAHAM, 1996 e MOORE et al., 2006). Vidament et al. (2001) afirmam que a presença do glicerol, nas concentrações de 2,5 a 6%, é um componente essencial em todos os diluidores convencionais utilizados para o congelamento de espermatozóides de garanhão. Quanto à forma de atuação, o glicerol é classificado como agente crioprotetor permeável, por atuar dentro do citoplasma celular (HOLT, 2000), é uma substância classificada como álcool de acordo com os grupos hidroxil presentes na sua composição que contem três moléculas de carbono (KEITH, 1998). Sendo assim, por ser um poliálcool com alta afinidade pela água, o glicerol tem a capacidade de provocar desidratação eficiente na célula (STOREY et al., 1998).

Em experimento sobre o uso alternativo de crioprotetores realizado por Hoffmann (2007), foi observado que o glicerol foi o crioprotetor mais eficaz na preservação da membrana plasmática e na manutenção da habilidade de capacitação dos espermatozóides.

Snoeck et al. (2007) relatam a necessidade da realização de experimentos referentes a composição dos meios de congelação, pois ainda não existe um consenso sobre o diluidor mais eficiente na preservação da viabilidade espermática para a

maioria dos ganhos. No entanto, o glicerol ainda é o crioprotetor mais comumente utilizado. Por isso, muitos autores buscam racionalizar a ação desse agente, maximizando o efeito crioprotetor e minimizando os efeitos deletérios que o mesmo apresenta à criopreservação (OLIVEIRA 2007).

Contudo, Hoffmann (2007) afirma que o glicerol é um crioprotetor líder, e pesquisas mais amplas são necessárias antes que ele seja substituído.

Snoeck et al. (2007) destacam que tanto a composição dos diluidores de congelação de sêmen quanto o envase utilizado, são fatores que podem afetar os resultados da criopreservação.

2.3 Envase do sêmen criopreservado

Igualmente importante como a escolha dos diluentes e dos crioprotetores para a preservação da viabilidade espermática, é a definição do tipo de envase para o sêmen equino.

Na década de 60, os pesquisadores Nagase e Niwa (1964) desenvolveram o método de armazenamento de sêmen congelado em pastilhas (*pellets*), originalmente utilizado para a criopreservação de sêmen bovino. Martin et al., (1979) propuseram o congelamento de sêmen equino em grandes volumes (palheta de 4ml) e obtiveram resultados satisfatórios de prenhez (63%).

A fim de reduzir os danos causados na estrutura e na funcionalidade dos espermatozoides durante a criopreservação, tornam-se necessários estudos sobre o processo ideal de congelação e estocagem (envase) das amostras de sêmen (CAVALCANTE et al., 2006).

De acordo com Loomis & Squires (2005) a maioria dos laboratórios comerciais congelam sêmen em palhetas de 0,5 ml, porém algumas amostras ainda são congeladas em macrotubos de 4,0 ou 5,0 ml. Na opinião de Saragusty et al., (2007) o envase em palhetas de 0,5ml é a forma mais difundida de processamento do sêmen equino. Em experimento realizado por Papa et al. (2005) com o objetivo de determinar o efeito do tipo de envase na criopreservação do sêmen equino, as mini-palhetas (0,25ml) foram mais eficientes do que as palhetas (0,5 ml) e os macrotubos

(4ml). Entretanto, de acordo com trabalho realizado por Crockett et al. (2001), não houve diferença entre as taxas de sobrevivência espermática após o envase em palhetas de 0,5ml ou 2,5ml. Green et al. (2006) ressaltaram, em experimento sobre a comparação entre palhetas de 0,25ml e saches de 15ml, o benefício da armazenagem de sêmen em grandes volumes.

Sendo assim, o sucesso da inseminação artificial depende também da manutenção da viabilidade da célula espermática durante o armazenamento.

Kozink et al. (2006) relataram que o uso de criotubos é uma solução para problemas relacionados a flutuação de temperatura no momento do envase, pois por armazenar mais volume permite que o procedimento seja realizado em menos tempo, além de possibilitar o armazenamento de maior volume de sêmen por canister, e também, substituir a necessidade da manipulação de várias palhetas. Esses autores enfatizam que no mesmo espaço podem-se armazenar quatro criotubos de 3,6ml ou dez palhetas de 0,5ml. Notrica et al. (2004) e Cavalcante et al. (2006) avaliaram o envase do sêmen humano em criotubos e concluíram sua eficácia. De acordo com Saragusty et al. (2007) a utilização de embalagens com maiores volumes proporciona o envase da dose inseminante em um único tubo, facilitando a identificação, o manuseio e o emprego do sêmen. Já Arav et al. (2002) avaliou o sêmen de bovinos criopreservado em tubos de vidro e observaram a redução de espaço e custos de armazenamento. Dessa forma, Kozink et al. (2006) afirmam que um volume maior de sêmen congelado pode ser estocado em um botijão padrão se congelado em criotubo.

2.4 Avaliação do sêmen criopreservado

A avaliação do sêmen é realizada considerando-se os aspectos macroscópicos, microscópicos e físicos do ejaculado (GRANEMANN, 2006). De acordo com o mesmo autor, volume, coloração, viscosidade e aspecto do sêmen são os parâmetros macroscópicos avaliados. Assim como a motilidade, vigor,

concentração e morfologia são os parâmetros microscópicos que devem ser observados (SILVA, 2000). A motilidade diz respeito ao percentual de espermatozóides móveis numa amostra, o vigor refere-se à força de deslocamento (em uma escala de 0 a 5) e a concentração espermática representa o número de espermatozóides no ejaculado (GRANEMANN, 2006).

Segundo Arruda et al. (2007) os parâmetros clássicos de importância na avaliação da viabilidade de amostras de sêmen fresco, resfriado ou congelado são a motilidade, concentração e morfologia espermáticas.

A motilidade é necessária para a ascensão espermática no útero, passagem através da junção útero-tubárica, liberação dos sítios de armazenamento espermático no oviduto e penetração através das células que circundam o ovócito (AMANN, 1989). De acordo com Kirk (2001) a motilidade pode estar comprometida se as mitocôndrias estiverem afunccionais, se a membrana plasmática estiver lesada, se o espermatozóide tiver sofrido choque-frio ou se estiver morfologicamente anormal.

A motilidade espermática é prontamente identificável e reflete diferentes aspectos do metabolismo espermático (KATILA, 2001). Este parâmetro pode ser avaliado por microscopia óptica e tem sido considerado um dos critérios de maior importância na avaliação da fertilidade do sêmen (MEDEIROS, 2003). Esta técnica apresenta vantagens por ser de baixo custo e de simples realização, porém trata-se de uma avaliação subjetiva que pode sofrer variações nos resultados dependendo da experiência do examinador (MEDEIROS, 2003). Ferreira (2000) comparou as metodologias de análise da motilidade espermática equina de forma subjetiva (microscopia óptica) com a motilidade espermática equina computadorizada (no monitor do aparelho Hamilton Thorn Motility Analyser) e concluiu que a avaliação subjetiva constitui num método aceitável para a determinação do percentual de espermatozóides móveis.

Outra técnica de análise seminal é o teste de termorresistência, que tem a finalidade de avaliar a longevidade espermática (OLIVEIRA, 2007). Segundo preconizado pelo CBRA (1998), as células espermáticas de ejaculados de garanhões incubadas a 38°C, por até 180 minutos, ainda devem apresentar 30% de motilidade espermática total e vigor espermático 3. Porém, Zúccari (1998) observou que, aos 90 minutos de incubação, as células apresentavam 20% de motilidade espermática e vigor espermático 2 e aos 120 minutos 10% de motilidade e vigor 2, concluindo que o tempo ideal para a avaliação do sêmen equino descongelado é de 120 minutos. Por

outro lado Fürst et al. (2005) empregaram o teste de termorresistência de 90 minutos para avaliar a longevidade dos espermatozóides (30% de motilidade aos 90 minutos).

A concentração espermática pode ser avaliada através da contagem de células na câmara de Neubauer ou de Toma Nova, podendo ser ainda utilizada a espectrofotometria e o Micro-cell-counter (CBRA, 1998). A concentração pode apresentar variação, tanto entre raças, como num mesmo animal (SILVA, 2003).

A avaliação das características morfológicas dos espermatozóides poderá ser observada através da utilização de esfregaços corados ou preparação úmida, em microscópio de contraste de fase ou de interferência diferencial (CBRA, 1998). As anormalidades podem ser classificadas como defeitos maiores e menores (BLOM, 1973), em defeitos de cabeça e cauda como sugeridas pelo CBRA (1998) ou ainda em defeitos primários e secundários (BLOM, 1977). Segundo Jasko et al., (1990), há correlação positiva entre taxa de fertilidade e espermatozóides morfolologicamente normais. Fernandes & Pimentel (2002) observam que a morfologia espermática pode ser considerada um fator essencial para a obtenção de melhor eficiência reprodutiva. De acordo com Oliveira (2007), o processo de criopreservação e o choque térmico podem estar associados ao aumento de incidências de patologias em um ejaculado.

2.5 Inseminação artificial com sêmen criopreservado

Embora a maior parte da literatura enfoque a congelação como a fase em que os danos ocorrem na célula espermática, os espermatozóides são passíveis de lesões físicas e estruturais durante o processo de criopreservação desde a colheita até o momento da inseminação artificial (GRAHAM, 1996).

O procedimento de inseminação na égua, geralmente, é feito utilizando-se uma pipeta rígida acoplada a uma seringa. Esta pipeta é guiada através da cervix com auxílio do dedo indicador e a deposição do sêmen é efetuada no corpo do útero (OLIVEIRA, 2007).

A utilização do sêmen congelado ainda é restrita, pois além de exigir um melhor controle do momento da ovulação, os resultados são inferiores aos obtidos com sêmen fresco e refrigerado (SQUIRES et. al., 1999). Igualmente importantes para o sucesso da concepção, são a motilidade, morfologia espermática,

acompanhamento sistemático do desenvolvimento folicular, a determinação do momento da ovulação a duração da viabilidade do óvulo no sistema genital da égua bem como a qualidade do ambiente uterino (SILVA FILHO, 1994).

Para o sucesso da inseminação artificial com sêmen congelado, além da necessidade deste estar com bons padrões pós-descongelamento, é essencial contar com um histórico reprodutivo das éguas que serão utilizadas. As fêmeas com idade acima de oito anos e com histórico de problemas reprodutivos têm, em geral, baixas taxas de prenhez e são candidatas em potencial a não conceberem (SAMPER et al., 2001). Em estudo recente Samper (2007) relatou um efeito significativo do estado da égua na taxa de prenhez, assim sendo as éguas mais velhas solteiras tiveram uma taxa de prenhez significativamente reduzida (27,7% em éguas solteiras > 8 anos contra 43,6% em éguas de solteira < 8 anos).

O estro da égua dura de 5 a 7 dias e a ovulação ocorre no terço final deste período, sendo que a inseminação deve ser realizada o mais próximo possível da ovulação (MIES FILHO, 1987). Deve-se realizar o acompanhamento folicular diário e utilizar a melhor técnica para a deposição do sêmen no ambiente uterino (ZIMMERMANN et al., 2009).

Segundo Samper (2001), quando se insemina éguas com sêmen congelado é importante usar um agente indutor da ovulação para maximizar o uso do sêmen, minimizando o número de doses por ciclo estral, resultando na redução do intervalo entre a inseminação e a ovulação.

O manejo adequado da égua inclui o uso de um agente ovulatório para acelerar a ovulação dentro de um tempo previsível de tempo. Agentes ovulatórios são mais eficazes em éguas com edema endometrial óbvio, com folículo de 35 mm de diâmetro e colo do útero relaxado (MILLER, 2008). Devido à grande variação no intervalo de ovulação após indução com hCG, as éguas devem ser examinadas de 6 – 6 horas a partir de 24h após a aplicação do hormônio e a inseminação realizada imediatamente após a detecção da ovulação (SAMPER, 2001).

De acordo com Squires et. al., (1999) a inseminação com sêmen congelado, deve ser realizada de 24 horas antes até 6 horas após a ovulação. Porém, para Vianna (2000) quanto mais próxima da ovulação for a inseminação com o sêmen diluído, mais alta será a taxa de concepção. Palmer (1984) obteve de 47 a 66% de prenhez em éguas inseminadas apenas uma vez no período de zero a 72 h após a ovulação.

Segundo Belling (1984) apenas uma cobertura/ inseminação após a ovulação é viável e traz com consequências benéficas por coleta de sêmen a redução na sobrecarga do garanhão, redução de traumas e de infecções sexualmente transmissíveis e um aumento do número de éguas servidas por um garanhão na estação reprodutiva, possibilitando uma maior eficiência econômica à atividade.

Miller (2008) afirma que cada laboratório tem geralmente um método de congelamento exclusivo, de modo que o número de espermatozóides embalados por palheta, bem como o número de palhetas por dose de inseminação, varia muito, não só pelo garanhão, mas também pelo centro de congelamento.

Com relação aos índices de fertilidade nas inseminações artificiais com sêmen equino congelado, Samper (2001) afirma não ser incomum encontrar taxas de prenhez por ciclo estral entre 0 e 100%. Martin et al. (1979), Muller (1982) e Pickett et al. (1975), indicam um variação entre 51,3% e 75%. Porém, de acordo com Saragusty et al. (2007) os resultados obtidos com sêmen congelado em média, variam entre 30 e 50%. Já de acordo com Oliveira (2007) podem oscilar entre 25 e 40%. Estas baixas taxas de prenhez para o sêmen congelado podem ser explicadas por alterações biofisiológicas que o espermatozóide sofre durante a criopreservação (TROEDSSON et al., 1998). Dessa forma, a baixa fertilidade é um dos fatores que restringe o uso de sêmen congelado na inseminação artificial na espécie equina (ALMEIDA, 2006).

De acordo com Juliani e Henry (2008) os protocolos de criopreservação de sêmen equino não conseguem proporcionar a manutenção da viabilidade espermática, que se traduza por taxas satisfatórias de prenhez após a inseminação artificial.

3 ARTIGO

CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN EQUINO ENVASADO EM CRIOTUBO

(Cryopreservation of equine semen loaded on cryotube)

Sabrina Leães Gomez Lorenzoni¹, Natália Schmitt Arruda¹, José Luiz Rodrigues¹

¹ Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução, UFRGS, Avenida Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, CEP 91540-000, Porto Alegre. E-mail: sabrina.leaes.gomez@gmail.com ou sabrinaleaes@yahoo.com.br

RESUMO

Na espécie equina, ao contrário do obtido com bovinos, as técnicas de criopreservação de sêmen progridem lentamente, mas apesar das barreiras técnicas o emprego da inseminação artificial com sêmen congelado vem crescendo. Este experimento foi dividido em três etapas: na primeira comparou-se a utilização de diferentes diluentes e técnicas de congelamento; determinação da eficiência do criotubo para envase do sêmen para a criopreservação; e na terceira determinou-se das taxas de prenhez das éguas artificialmente inseminadas com sêmen congelado envasado em criotubo. Seis garanhões foram submetidos à coleta do sêmen e doze éguas foram inseminadas artificialmente no primeiro estro da estação reprodutiva. As amostras foram diluídas em INRA82 ou Nagase, contendo 5% de glicerol, com concentração de 200×10^6 espermatozoides/ml. Parte do sêmen diluído foi envasado em palhetas (0,5ml), das quais uma parte foi imediatamente congelada. As palhetas restantes foram resfriadas previamente da temperatura ambiente (24°C) até 5°C antes do congelamento. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30seg. O mesmo protocolo de congelamento com resfriamento prévio foi realizado com as

amostras envasadas em criotubos, sendo estas amostras descongeladas a 50°C por 100seg em banho-maria. A eficiência *in vivo* do sêmen criopreservado, foi determinada através da inseminação artificial. O diagnóstico de prenhez foi realizado 20 dias após a inseminação artificial através de exame ultrassonográfico. Após a análise dos dados verificou-se que não houve diferença significativa entre os diluentes testados na motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides. As médias da motilidade espermática após o aquecimento das amostras foram de: 43,32% e 26,66%, para o sêmen diluído com INRA82 submetido ao resfriamento ou não antes do congelamento, respectivamente. O sêmen diluído com Nagase revelou motilidade espermática de 41,08% e 24,44%, respectivamente. De acordo com esses resultados, os grupos experimentais submetidos ao resfriamento prévio apresentaram taxas de motilidade espermática superiores aos grupos que foram congelados diretamente. Não se verificou diferenças quanto ao vigor, motilidade e defeitos espermáticos entre os diluentes testados e os tipos de envase. As éguas inseminadas com criotubo apresentaram taxa de prenhez de 50% (3/6), já com as éguas do grupo controle (palheta) observou-se 16,66% (1/6).

Palavras chave: sêmen, equino, criopreservação, criotubo

ABSTRACT

In the horse industry, unlike observed in ruminants, the development of sperm cryopreservation techniques is very slow but despite the technical barriers the artificial insemination with frozen semen is growing. This experiment was divided into three steps. The first one compared the use of different diluents and freezing techniques. The other two stages were the use of cryogenic tubes for storing semen and the determination of mare pregnancy rates that were artificially inseminated with frozen semen packaged in cryogenic tubes. Six stallions were submitted to semen collection and twelve mares were artificially inseminated at first estrus of the breeding season. The samples were diluted in INRA82 or Nagase, containing 5% glycerol, with a concentration of 200×10^6 sperm / ml. A fraction of the diluted

semen was stored in straws (0.5 ml), some of those straws were immediately frozen. The remaining straws were cooled from room temperature ($\pm 24^{\circ}\text{C}$) to 5°C before freezing. The samples were thawed in a water bath at 37°C during 30sec. The same protocol with cooling prior to freezing was performed with samples filled into cryogenic tubes, and these samples were thawed in a water bath at 50°C during 100sec. The *in vivo* efficiency of cryopreserved semen was determined through artificial insemination. The pregnancy diagnosis was performed after 20 days by ultrasound examination. After analyzing the data it was found that there was no significant difference in sperm motility and vigor among the tested diluents. Motility was INRA82: 43.32% / 26.66% and Nagase: 41.08% / 24.44%, when the semen was previously cooled or frozen directly, respectively. According to these results, the experimental groups subjected to cooling prior freezing showed better motility rates than the groups that were frozen directly. There were no differences regarding the vigor, motility and sperm defects among the diluents and the semen containers. The mares inseminated with cryotubes showed 50% (3/6) pregnancy rate, and 16.66% (1/6) pregnancy rate was observed in the group of mares inseminated with straws.

Keywords: semen, equine, cryopreservation, cryotube.

3.1 Introdução

Nos últimos vinte anos as técnicas de reprodução assistida alcançaram um acelerado avanço nas espécies domésticas de interesse econômico. Até o momento o gameta masculino é o que tem proporcionado maior sucesso utilizado como ferramenta de melhoramento animal. De acordo com Melo et al. (2007) a preservação e o estoque de sêmen promovem um melhor emprego do potencial reprodutivo de animais com patrimônio genético superior. Na espécie equina, ao contrário do obtido com bovinos, as técnicas de criopreservação de sêmen progredem lentamente, mas apesar das barreiras técnicas o emprego da inseminação artificial

equina vem crescendo (Kirk, 2005). De acordo com Saragusty et al. (2007) os resultados obtidos com sêmen congelado em média, variam entre 30 e 50%, esses resultados revelam que a criopreservação do sêmen ainda não é uma tecnologia estabelecida na reprodução equina.

Usualmente o sêmen equino é envasado em palhetas de 0,5ml (Saragusty et al., 2007), no entanto existem alternativas que empregam maiores volumes como, por exemplo: macropalhetas de 4 ml (Martin et al., 1979), macrotubo de vidro de 12 ml (Saragusty et al., 2007), macrotubo de alumínio de 25ml (Tischner, 1979) e sachê de 15 ml (Green et al., 2006). Além desses autores, Kozink et al. (2006) descreveram a criopreservação do sêmen equino envasado em criotubos de 3 ou 6 ml. Notrica et al. (2004) e Cavalcante et al. (2006) utilizaram criotubos com sucesso para congelação de sêmen humano. Porém o estudo comparativo entre palheta de 0,5ml e criotubo de 2ml, assim como, a inseminação artificial com sêmen envasado em criotubo de 2ml ainda não foi documentado na espécie equina.

Os objetivos do experimento foram determinar as taxas de motilidade e vigor espermáticos do sêmen imediatamente congelado ou previamente resfriado, diluído em INRA82 ou Nagase. Segundo, determinar as taxas de sobrevivência espermática de amostras diluídas em Nagase e envasadas em criotubo de 2 ml. Terceiro, determinar a taxa de prenhez e de potros nascidos de éguas inseminadas com sêmen envasado em criotubo.

3.2 Materiais e Métodos

Os sais e reagentes quando não identificados no texto, foram fornecidos pela Sigma Aldrich Ltda. As soluções diluentes utilizados nos experimentos, foram elaborados no Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução, UFRGS.

O experimento foi dividido em três etapas. A primeira foi realizada no Haras Warszawsky localizado no município de Porto Alegre, latitude 30° e longitude 51°, comparando a eficiência de dois diluentes e duas técnicas de congelação. Os dados obtidos permitiram a definição do protocolo de criopreservação do sêmen a ser empregado nas demais etapas. Na Coudelaria de Rincão, localizada no município de São Borja, latitude 28° e longitude 56°, no estado do Rio Grande do Sul foram

realizadas as outras duas etapas, onde foi testada, *in vitro* e *in vivo*, a utilização de criotubo para envase do sêmen criopreservado.

Os animais utilizados nos experimentos pertenciam às raças Crioula, Quarto de Milha e Brasileiro de Hipismo. Seis garanhões, com idade média de cinco anos, foram selecionados após serem submetidos ao exame andrológico e apresentarem sêmen com motilidade acima de 70%. Foram disponibilizadas para este estudo doze éguas solteiras (vazias na temporada), com idade entre 4 e 17 anos. Estas foram inseminadas artificialmente no primeiro estro da estação reprodutiva por solicitação do administrador da propriedade.

Uma égua em estro, devidamente contida, foi utilizada como manequim e a coleta do sêmen realizada com auxílio da vagina artificial (modelo Hannover). Os ejaculados, em número de três de cada garanhão, foram coletados em intervalos de 48h.

O sêmen coletado foi avaliado quanto ao aspecto, odor, coloração, volume, motilidade, vigor, pH, morfologia espermática e concentração. Antes da avaliação o ejaculado foi filtrado com auxílio de gaze estéril para separação da fração de gel. A motilidade foi avaliada de 0 a 100% e o vigor em escala de 0 a 5, com auxílio de microscópio (200X), utilizando uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C. Duas amostras foram segregadas para análise posterior; uma amostra foi reservada para avaliação da concentração em câmara de Neubauer, contendo sêmen diluído em solução formol-salina (1:20), e outra amostra para a análise de morfologia espermática através de preparação úmida e avaliação por microscopia de contraste de fase. Este último foi realizado de acordo com Blom (1973), classificando os defeitos espermáticos em menores e maiores.

O diluente descrito por Kenney et al. (1975), a base de leite desnatado, foi utilizado para a centrifugação, na proporção de uma parte de sêmen para uma parte de diluente. Após a adição do diluente o sêmen foi transferido para oito tubos cônicos de plástico, e então centrifugado a 400 x g por 10 min (Snoeck et al., 2007). O sobrenadante foi retirado e os pellets foram ressuspensos com o diluente de congelação, ajustando a concentração das amostras para 200×10^6 espermatozoides/ml.

As amostras de sêmen foram diluídas nos diluentes descritos por Palmer et al. (1984), INRA82, ou por Nagase & Niwa (1964), ambos contendo 5% de glicerol.

O sêmen diluído de cada ejaculado foi envasado em oito palhetas (0,5 ml), das quais quatro foram imediatamente congeladas, através de exposição ao vapor de nitrogênio (-120°C) durante 15 minutos, após mergulhadas em nitrogênio líquido e finalmente estocadas em botijão criogênico. As quatro palhetas restantes foram resfriadas previamente da temperatura ambiente (24°C) a 0,25°C/min até 5°C em tubo de vidro submerso em álcool 70° mantido em refrigerador doméstico. As palhetas, 15 minutos após atingirem a temperatura de 5°C, foram submetidas ao mesmo processo de congelamento descrito acima. As amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 seg. O protocolo de congelamento do sêmen envasado em criotubo foi o mesmo descrito anteriormente. Como não foi encontrado em literatura o tempo e temperatura de descongelamento de sêmen envasado em criotubo de 2ml, foram realizados neste experimento testes de tempo e temperatura ideal, chegando a temperatura de descongelamento a 50°C durante 100 seg em banho-maria.

O teste de termorresistência (TTR) foi realizado após o descongelamento do sêmen, sendo que as amostras foram depositadas em Eppendorfs de 2 ml e incubadas em estufa a 38°C. Avaliações quanto à motilidade e vigor foram realizadas após 30, 60, 90 e 120 minutos.

A eficiência *in vivo* do sêmen criopreservado, foi determinada através da inseminação artificial. Nas fêmeas que apresentaram folículo ovariano com diâmetro igual ou superior a 40 mm foi administrado 1.500UI (1,0 ml) de hCG (Profasi[®]) endovenoso (Sieme et al. 2004). As éguas foram inseminadas o mais próximo do momento da ovulação, sendo realizado o controle da dinâmica folicular, com auxílio da ultrassonografia em intervalos de 6 horas. Após receberem o hCG as fêmeas foram divididas aleatoriamente em dois grupos e submetidas à inseminação artificial única com o conteúdo de quatro palhetas francesas de 0,5ml ou de um criotubo de 2ml, com concentração espermática total de 400×10^6 . A inseminação artificial foi realizada pelo método convencional (na qual a mão enluvada do inseminador guia uma pipeta até a passagem da cérvix) e o sêmen foi depositado no corpo do útero. O diagnóstico de prenhez foi realizado após 20 dias através de exame ultrassonográfico e confirmado em novo exame aos 90 dias.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística através da análise de Variância para Medidas Repetidas do programa SAS do Departamento de Estatística do Instituto de Matemática da UFRGS.

3.3 Resultados

A tabela 1 apresenta os dados da avaliação seminal dos reprodutores realizada imediatamente após a coleta. Os valores representam a média de três ejaculados de cada garanhão e preenchem os padrões recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), para a criopreservação de sêmen equino.

Tabela 1- Médias da avaliação pré-congelamento (sêmen fresco) da motilidade e vigor espermáticos.

Garanhão	Motilidade (%) χ	Vigor (0 – 5) χ
A	73,3	4,0
B	83,3	3,6
C	83,3	3,3
D	75,0	3,3
E	76,6	3,6
F	81,6	4,0

A tabela 2 revela que a média da motilidade espermática foi maior nas amostras congeladas após o resfriamento. O vigor dos espermatozoides não apresentou diferença entre as amostras congeladas imediatamente após a coleta ou previamente resfriadas.

Tabela 2- Avaliação da motilidade e vigor espermáticos, pós descongelamento, do sêmen resfriado e não resfriado.

Garanhão	Diluyente	Sêmen resfriado		Sêmen não resfriado	
		motilidade (%)	vigor (0 -5)	motilidade (%)	vigor (0 -5)
A	INRA	48,3 ^{Aa}	3,3	25,0 ^{Ba}	3,0
	Nagase	41,6 ^{A ab}	3,0	25,0 ^{Ba}	3,0
B	INRA	40,0 ^{Aab}	3,3	31,6 ^{Aa}	3,0
	Nagase	35,0 ^{A b}	3,0	16,6 ^{Bb}	3,0
C	INRA	41,6 ^{Aab}	3,3	23,3 ^{Bab}	3,0
	Nagase	46,6 ^{A a}	3,0	31,6 ^{Ba}	3,0

A,B(linha); a,b(coluna): p < 0,05

A tabela 3 apresenta as características espermáticas examinadas, onde não foram constatadas diferenças entre os dados referentes às amostras de sêmen descongeladas envasadas em criotubo ou em palheta.

Tabela 3- Avaliação pós-descongelamento das amostras de sêmen criopreservadas envasadas em palhetas ou criotubos.

Gar	Palheta				Criotubo			
	Mot (%)	Vigor (0 – 5)	Def menores (%)	Def maiores (%)	Mot (%)	Vigor (0 – 5)	Def menores (%)	Def maiores (%)
D	28,3	3,0	12,6	13,3	30,0	3,0	12,6	12,0
E	36,6	3,0	10,6	11,3	40,0	3,0	10,0	10,6
F	55,0	3,0	12,6	12,0	55,6	3,0	9,3	11,3

A análise do vigor espermático revelou que os resultados obtidos mostraram não haver diferença entre os diluentes, técnica de congelamento e tipo de envase (Tabelas 2 e 3).

O teste de termorresistência realizado nas amostras envasadas em criotubo ou palheta, referentes aos ganhões D, E e F, mostrou que aos 120 minutos pós descongelamento a motilidade espermática média caiu para 5,5% e vigor 1 (palheta) e 5,1% e vigor 1 (criotubo)

Os resultados das taxas de prenhez obtidas com a inseminação artificial com o sêmen envasado em palhetas ou criotubos apresentaram para o grupo controle (palheta) uma taxa de 16,6%, onde em seis éguas inseminadas, uma engravidou. O grupo testado (criotubo) apresentou 50% de prenhez, das quais três éguas engravidaram entre as seis que foram inseminadas.

3.4 Discussão

A capacidade fecundante do sêmen congelado é influenciada por vários fatores incluindo garanhão, características seminais, técnica de congelamento, dose inseminante, assim como status e manejo da égua (Saragusty et al., 2007). Considerando que o glicerol é o crioprotetor mais comumente usado na criopreservação do espermatozóide equino (Moore et al., 2006; Alvarenga et al., 2005) investigou-se primeiro a eficiência de dois diluentes em promover a sobrevivência dos espermatozóides congelados. A utilização de dois procedimentos de criopreservação, um resfriando o sêmen antes da congelação e o outro expondo o sêmen diretamente ao vapor de nitrogênio líquido não revelaram diferenças entre os dois crioprotetores em proporcionar sobrevivência espermática avaliada através da motilidade e do vigor dos espermatozóides (Tabela 2). Por outro lado a comparação dos procedimentos de criopreservação empregados, resfriando-se previamente o sêmen ou congelando diretamente, revelou diferenças significativas na sobrevivência espermática tanto do sêmen diluído em INRA82, como no diluído com Nagase (Tabela 2). Fürst et al. (2005) observou, em estudo semelhante, que a taxa de motilidade total do sêmen congelado resfriado previamente (46,7%) foi superior ao protocolo sem resfriamento (25,20%). Desta forma, Vidament et al. (2000) utilizando o diluidor INRA82 obtiveram 47% de motilidade espermática com o sêmen previamente resfriado a 4°C, e somente 23% com o sêmen exposto diretamente ao vapor de nitrogênio líquido.

Na avaliação da sobrevivência do sêmen através do teste de termorresistência, observou-se que independente do tipo de envase houve queda de motilidade e vigor espermáticos ao longo do teste. Esta redução foi observada por Oliveira (2007) e Fürst et al. (2005), porém estes utilizaram somente palhetas como método de envase. Por outro lado, Zúccari (1998), que descreveu a técnica utilizada neste experimento, observou 10% de motilidade e vigor 2 aos 120 minutos, contra nossos resultados para este mesmo tempo que foram 5,55% de motilidade e vigor 1 (valor médio quando envasado em palheta) e 5,11% e vigor 1 (valor médio quando envasado em criotubo).

Em observação ao tipo de envase, Kozink et al. (2006) obtiveram a média de motilidade espermática do sêmen equino envasado em criotubo (3,6ml) de 39,3%,

percentual semelhante aos 41,9% (2ml) observados em nosso experimento. Estes autores também não obtiveram diferença significativa entre os tipos de envases testados. Dell'Aqua Jr. & Papa (2001) compararam três tipos de envase: mini-palhetas (0,25ml), palheta francesa (0,5ml) e macrotubo (4ml), e concluíram que as mini-palhetas apresentaram resultados superiores. Este dado difere do por nós observado, pois as taxas de motilidade espermática foram semelhantes quando o sêmen foi envasado em criotubos de 2ml ou em palhetas francesas de 0,5ml. Porém, pode-se levar em consideração a observação de Arav et al. (2002), de que o dano celular é minimizado quando o sêmen é congelado em grandes volumes. Assim como, a observação de Saragusty et al. (2007), que obteve maior motilidade progressiva pós descongelamento quando o sêmen foi envasado em criotubo (palheta 0,5ml: $37\% \pm 1$ e criotubo 12ml: $50\% \pm 2$).

A vantagem do criotubo é observada quando, geralmente, várias palhetas são necessárias para completar uma dose inseminante na égua e, com apenas um criotubo pode-se obter esta mesma dose. Pois de acordo com Samper & Morris (1998) uma única dose inseminante usualmente consiste na utilização de diversas palhetas. De acordo com Kozink et al. (2006) o uso de múltiplas palhetas aumenta os riscos de insucessos, pois as mesmas necessitam ser descongeladas, secadas, cortadas, ter os conteúdos esvaziados e posteriormente reunidos em uma dose inseminante. A dose inseminante dividida entre várias palhetas aumenta os riscos de contaminação, dano, perda ou erro (Saragusty et al., 2007). De acordo com Tyler et al., (1996), enquanto o lapso de tempo para uma palheta submetida à temperatura ambiente é de 40s, o do criotubo é quase o dobro. Desta forma, observou Saragusty et al. (2007), que uma amostra de grande volume (12ml), após ter sido retirada do nitrogênio líquido, demorou mais de dois minutos em temperatura ambiente para atingir a temperatura de -100°C .

Em estudo realizado por Arav et al. (2002) com sêmen bovino congelado em tubo de 12ml, foi observado que em relação à dose inseminante, o sêmen envasado em palhetas ocupa 6,5 vezes mais espaço do que o sêmen envasado em tubos de 12ml. A praticidade deste tipo de envase são descritas também por Cavalcante et al. (2006) que afirma que além de ser de fácil preenchimento e identificação, o envase em criotubo é de aceitação internacional.

Kozink et al. (2006) afirmaram que a qualidade pós descongelamento do sêmen envasado em criotubo é aceitável e permite a embalagem de uma dose

reprodutiva padrão por envase. Desta forma, observamos que a manipulação de criotubos é fácil, rápida, segura e otimiza a capacidade de armazenamento nos botijões criogênicos, assim como, permite o envase da dose inseminante em um único recipiente, facilitando desta forma o procedimento da inseminação artificial.

De acordo com Saragusty et al. (2007) o crescimento do uso de criobancos de sêmen, a demanda por espaço e custos de armazenamento poderá aumentar. Contudo, a criopreservação em criotubos permite considerável redução de riscos, de espaço físico e de custo de armazenamento (Arav et al., 2002).

A capacidade fecundante do sêmen criopreservado foi verificada através da inseminação artificial das éguas no primeiro estro da estação reprodutiva, com apenas uma inseminação realizada próximo ao momento da ovulação. Também com apenas uma inseminação por ciclo estral, Sieme et al. (2003) utilizou 8 palhetas de 0,5ml/IA e obteve a média de 42,2% de prenhez, resultado semelhante ao de Miller (2008) que obteve 45% de taxa de prenhez por ciclo. Vidament et al. (2000) obtiveram 54% de prenhez nas éguas inseminadas com palhetas no primeiro ciclo. No entanto nossos resultados apresentaram uma taxa de prenhez das éguas do grupo controle de 16,6% (1/6). Por outro lado, Oliveira (2007) obteve 11,9% e Medeiros (2003) não obteve gestações ao inseminar 15 éguas também utilizando palhetas de 0,5ml.

As éguas inseminadas com criotubo apresentaram taxa de prenhez de 50%, porém não foram submetidas a teste estatístico em função do reduzido número amostral.

Não foram encontrados na literatura consultada dados relativos à inseminação artificial de éguas utilizando como tipo de envase criotubos. De acordo com Aurich et al. (1996) esses resultados insatisfatórios se devem à capacidade fecundante reduzida do sêmen congelado, principalmente, atribuídos à mudanças na estrutura da membrana causadas pelo resfriamento, congelamento e aquecimento das amostras.

3.5 Conclusões

As taxas de motilidade espermáticas foram maiores quando o sêmen foi previamente resfriado, independente do diluente utilizado.

A sobrevivência espermática das amostras diluídas em criotubo foi semelhante às amostras envasadas em palhetas.

As taxas de prenhez das éguas obtidas com a inseminação artificial com o sêmen envasado em criotubos mostraram que esta é uma alternativa viável na criopreservação de sêmen equino.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion sêmen: a review. **Animal Reproduction Science**. 89: 105-113. 2005.

ARAV, A.; ZERON, Y.; SHUTURMAN, H.; GACITUA, H. Successful pregnancies in cows following double freezing of a large volume of semen. **Reproduction Nutrition Development**. 42: 583-586. 2002.

AURICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**. 46: 791-797. 1996.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**. 25: 383-391. 1973.

CAVALCANTE, M.B.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, D.O.; TELES, E.P.B.; Criopreservação de sêmen humano – comparação entre métodos de congelação e tipos de envase. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 28(12): 708-14. 2006.

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

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

FÜRST, R.; CARVALHO, G. R.; FÜRST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 57 (5): 599-607. 2005.

GRENN, J.E.; FASTER, K.; DRAPER, D.; MORRIS, G.J.; GROUT, B.W. Field preservation of large volumes of equine semen under field conditions: potential for genetic conservation. **Cryobiology**. 53: 378. 2006.

JULIANI, G.C.; HENRY, M. Efeito do glicérol, etilenoglicol, acetamida e leite desnatado na criopreservação de espermatozoides equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 60(5). 1103-1109. 2008.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: **21th Proceedings of the Annual Convention American Association Equine Practitioners**. (Boston, U.S.A.). pp.327-336. 1975.

KIRK, E.S.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Comparasion of in vitro laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**. 64: 1422-1439. 2005.

KOZINK, D.M.; RUBIO, C.; PINTO, C.R. Cryopreservation of stallion spermatozoa in polypropilene cryotube vials. **Animal Reproduction Science**. 94, 96-98. 2006.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GÜNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**. (Suppl 27): 47-51. 1979.

MEDEIROS, A.S.L. 2003. **Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária**. Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhão. 96f. Botucatu, SP. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista.

MELO, C.M.; ZAHN,F.S.; MARTIN, I.; ORLANDI, C.; DELL'AQUA, J.A.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Influence of semen storage and cryoprotectant on post-thaw viability and fertility of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**. 27(4): 171-175. 2007.

MILLER, C.D. Optimizing the use of frozen-thawed equine sêmen. **Theriogenology**. 70: 463-468. 2008.

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; BRUEMMER, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**. 26 (5): 215-218. 2006.

NAGASE, H.; NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. In: **V Congresso Internazionale per La Riproduzione Animale e la Fecondazione Artificiale**. (Trento – Itália). pp. 410-415. 1964.

NOTRICA, J.; DIVITA, A.; NEUSPILLER, F.; ARENA, G.; DE FRIED, E.P. Health girl born after cryopreservation of gametes and ICSI in a patient with seminoma. **Reproductive Biomedicine Online**. 9 (6): 620-622. 2004.

OLIVEIRA, R.A. 2007. **Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária**. Índice de prenhez com sêmen congelado de garanhões crioulos usando glicerol ou dimetilformamida como crioprotetores. 46f. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

OLIVEIRA, F.J.G. 2007. **Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária**. Efeito da adição de glicerol em diferentes etapas do resfriamento sobre a congelabilidade do sêmen de garanhões. 51f. Viçosa, MG. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: Proceedings of the **10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**. (Urbana-Champaign, E.U.A.). pp.377-379. 1984.

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

SARAGUSTY, J.; GACITUA, M.T.; ARAV, A. Directional freezing of Equine Semen in Large Volumes. **Reproduction in Domestic Animals**. 42: 610-615. 2007.

SIEME, H.; SCHÄFER, T.; STOUT, T.A.E.; KLUG, E.; WABERSKI, D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. **Theriogenology**. 60: 1153-1164. 2003.

SIEME, H.; KATILA, T.; KLUG, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. **Theriogenology**. 61: 769-784. 2004.

SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descpngelação de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 59 (1): 56-64. 2007.

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

TYLER, J.P.; KIME, L.; COOKE, S.; DRISCOLI, G.L. Temperature change in cryo-containers during short exposure to ambient temperatures. **Human Reproduction**. 11: 1510-1512. 1996.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P. Centrifugation and addition of glycerol at 22°C instead of 4°C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**. 54: 907-919. 2000.

ZÚCCARI, C.E.S. 1998. **Tese de Doutorado em Medicina Veterinária**. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. 121p. Botucatu, SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

4 Considerações finais e perspectivas

Com o aumento na demanda da produtividade dos reprodutores, assim como na preservação de espécies ameaçadas de extinção, os bancos de sêmen tenderão a aumentar a capacidade de armazenamento de amostras. Assim, se faz necessário a otimização de espaços nos criobancos. Uma alternativa para esta projeção será a utilização de criotubos, os quais apresentam eficácia e segurança para armazenamento de células criopreservadas.

Além disso, a utilização da criopreservação de sêmen equino poderá diminuir a incidência de doenças sexualmente transmitidas, assim como acidentes que podem ocorrer durante as coberturas, reduzindo desta forma os gastos dos produtores com transporte de garanhões ou éguas para reprodução, alimentação e estabulagem.

Na busca de ferramentas capazes de aumentar as taxas de prenhez, as técnicas de criopreservação devem ser aperfeiçoadas e padronizadas.

Para futuros experimentos com congelamento de sêmen equino envasado em criotubos, sugere-se o aumento do número de fêmeas a serem submetidas à inseminação artificial, assim como a padronização por idade e categoria reprodutiva das fêmeas, para que não comprometa o índice reprodutivo do macho e possamos obter resultados estatisticamente consistentes relativos aos testes *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J L. 2006. **Dissertação de Mestrado**. Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino. Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 77p.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, v32 (6), p 541-545, 2000.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion sêmen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.

AISEN, E.G.; MEDINA, V.H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram sêmen frozen in different trehalose concentrations. **Theriogenology**, v57, p1801-1808, 2002.

AMANN, R.P. Can the fertility potencial of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v10, p89-98, 1989.

ARAV, A.; ZERON, Y.; SHUTURMAN, H.; GACITUA, H. Successful pregnancies in cows following double freezing of a large volume of semen. **Reproduction Nutrition Development**. 42: 583-586. 2002.

ARRUDA, R. P. 2000.**Tese de Doutorado**. Avaliação dos efeitos dos diluentes e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso da microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análise computadorizada da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). São Paulo, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do

potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31. n.1, p.8-16, 2007.

ÁVILA-PORTILLO, L.M.; MADERO, J.I.; LÓPEZ, C.; LÉON, M.F.; ACOSTA, L.; GÓMEZ, C.; DELGADO, L.G.; GÓMEZ, C.; LOZANO, J.M.; REGUERO, M.T. Fundamentos de criopreservación. **Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecologia**, v.57, n.4, p.291-300, 2006.

BARKER, C.A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.2, p.47-51, 1957.

BELLING, T. H. Postovulatory breeding and related reproductive phenomena in the mare. **Equine Practice**, v6, n6, p12-19, 1984.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**. 25: 383-391. 1973.

BLOM, E. Sperm morphology with reference to Bull infertility. In: **First All India Symposium Animal Reproduction**, p 61 – 81, 1977.

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

BUSTAMANTE FILHO, I.C. 2006. **Dissertação de Mestrado**. Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen equino. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Zootecnia.

CAVALCANTE, M.B.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, D.O.; TELES, E.P.B. Criopreservação de sêmen humano – comparação entre métodos de congelação e

tipos de envase. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 28 (12), 708-714, 2006.

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

COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P.; PICKETT, B.W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology** 22, 25-38. 1984.

CROCKETT, E.C.; GRAHAM, J.K.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Effect of cooling equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility: preliminary results. **Theriogenology**, v.55, p.793-803, 2001.

DIETZ, J.P.; SERTICH, P.L.; BOSTON, R.C.; BENSON, C.E. Comparison of ticarcillin and piperacillin in Kenney's semen extender. **Theriogenology**, v.68, p.848-852, 2007.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v42, p251-260, 1996.

FERNANDES, C.E.; PIMENTEL, C.A. Características seminais e fertilidade em garanhões. **Ciência Rural**, v.32, n.5, p.829-834, 2002.

FERREIRA, J. C. P. 2000. **Tese de Doutorado**. Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelção do sêmen equino. 113f. Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FIALA, S.M.E. 2004. **Tese de Doutorado**. Transporte espermático e resposta inflamatória na égua após a inseminação com diferentes concentrações de espermatozoides. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre.

FOULKES, J.A. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**. V49, p227-284, 1977.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M.; MAFILLI V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 57 (5): 599-607. 2005.

GILMORE, J.A.; McGANN, L.E.; LIU, J.; GAO, D.Y.; PETER, A.T.; KLEINHANS, F.W.; CRITSER, J.K. Effects of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v53, p.985-995, 1995.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary clinics of North America: Equine Practice**, v.12, n.1, p.131-147, 1996.

GRANEMANN, L.C. 2006. **Dissertação de Mestrado**. Avaliação comparativa do sêmen equino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós orquiectomia. Curso de Pós-Graduação em Ciências veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

GREEN, J.E.; FASZER, K.; DRAPER, D.; MORRIS, G.J.; GROUT B.W. Field preservation of large volumes of equine semen under field conditions: potential for genetic conservation. **Cryobiology**. 53: 378. 2006.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v.29, p.26-38, 1992.

HOFFMANN, N. 2007. **Dissertação de Mestrado**. Effekte alternative Kryoprotektiva auf die vitalität und Chromatinintegrität tiefgefrorener Hengstspermatozoen. Tierärztliche Hochschule Hannover.

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

HOVATTA, O. Cryopreservation of ovarian and testicular tissue. **Best Practice Research Clinic, Obstetrics and Gynecology**. 17(2), p.331-42, 2003.

JASKO, D.J.; LEIN, D.H.; FOOTE, R.H. Determination of the relationship between sperm morphologic classification and fertility in stallions: 66 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 3: 389-394. 1990.

JULIANI, G.C.; HENRY, M. Efeito do glicérol, etilenoglicol, acetamida e leite desnatado na criopreservação de espermatozoides equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 60(5). 1103-1109. 2008.

KATILA, T. In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review. **Acta Veterinaria. Scandinavica**. v.42, n.2, p.199-207, 2001.

KEITH, S. L. 1998. **Dissertação de Mestrado**. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Fort Collins, Colorado State University.

KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W. L.; MORSE, G. W. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *In: 21th Proceedings of the Annual Convention American Association Equine Practitioners*. (Boston, U.S.A.) p.327-336. 1975.

KIRK, E.S. 2001. **Dissertação de Mestrado**. Flow cytometric evaluation of stallion sperm. Colorado State University. Fort Collins, 131p.

KOZINK, D.M.; RUBIO, C.; PINTO, C.R. Cryopreservation of stallion spermatozoa in polypropylene cryotube vials. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.96-98, 2006.

LOOMIS, P.R.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Fertility of unfrozen and frozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packaged in straw. **Journal of Animal Science**, v56, p 687-693, 1983.

LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E. L. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v.64, p. 480-491, 2005.

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

MATTOS, R. 1995. **Dissertação de Mestrado**. Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária.

MEDEIROS, A.S.L. 2003. **Dissertação de Mestrado**. Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozóides de garanhão. Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-graduação em Medicina veterinária.

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

MELO, C. 2005. **Dissertação de Mestrado**. Efeito do armazenamento por 24 horas em diferentes sistemas de refrigeração sobre a viabilidade e fertilidade de sêmen congelado equino. Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

MELO, M.I.V.; HENRY, M.; BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.757-763, 2005.

MIES FILHO, A. **Reprodução de Animais Domésticos e Inseminação Artificial**. 4ª ed., Ed Sulina, 1977, Porto Alegre.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais**. 6ªed. Ed Sulina. 1987, Porto Alegre. 314p.

MILLER, C.D. 2008. Optimizing the use of frozen-thawed equine sêmen. **Theriogenology**. 70: 463-468.

MOORE, A.I.; SQUIRES, E.L.; BRUEMMER, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cooling rate and cyoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 26, n 5, p.215-218, 2006.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective affect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, 57, p1695-1706, 2002.

NAGASE, H.; NIWA, T. Deep freezing bull semen in concentrated pellet form. *In: V Congresso Internazionale per la Riproduzione Animale e la Fecondazione Artificiale*. (Trento – Itália). p. 410-415, 1964.

NOTICA, J.; DIVITA, A.; NEUSPILLER, F.; ARENA, G.; De FRIED, E.P. Health girl born after cryopreservation of gametes and ICSI in a patient with seminoma. **Reproductive Biomedicine Online**. 9 (6): 620-622. 2004.

OLIVEIRA, F.J.G. 2007. **Dissertação de Mestrado**. Efeito da adição de glicerol em diferentes etapas do resfriamento sobre a congelabilidade do sêmen de garanhões. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária.

OLIVEIRA, R.A. 2007. **Dissertação de Mestrado**. Índice de prenhez com sêmen congelado de garanhões crioulos usando glicerol ou dimetilformamida como crioprotetores. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária.

PAPA, F.O. 1987. **Tese de Doutorado**. Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de equinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PAPA, F O.; MELO, C.M.; DELL'AQUA, J.A.; MACEDO, L.P.; CARVALHO, A.G.; ALVARENGA, M.A.; MEDEIROS, A.S.L. Inovações Metodológicas na Biotecnologia de refrigeração e congelamento de sêmen equino. **Acta Scientiae Veterinariae**. 33 supl.1, p.19-27, 2005.

PALMER, E. Factors affecting stallion sêmen survival and fertility. *In: Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. (Urbana-Champaign, E.U.A.). pp.377-379. 1984.

PICKETT, B.W.; SULLIVAN, J.J.; BYERS, M.S. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **Fertility and Steril**, v26, p167-174, 1975.

PICKET, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, n.5, p.289-302, 1987.

PICKETT, B.W.; BURWASH, L.D.; VOSS, J.L.; BACK, D.G. Effect of seminal extender on equine fertility. **Journal of Animal Science**, v.40, n.6, p.1136-1146, 1975.

ROSSI, T.C.; PAPA, F.O.; SANTOS, T.B.; MACEDO, L.P.; ALVARENGA, M.A.; MELO, C.M.; DELL'AQUA JR, J.A. Efeito da utilização de diferentes crioprotetores e suas associações no processo de congelamento de sêmen equino com meio MP50. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V 27, p 350-352, 2003.

SALOMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram sêmen. **Animal Reproduction Science**, v62, p77-111, 2000.

SAMPER, J.C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Animal Reproduction Science**, V 68, P219-228, 2001.

SARAGUSTY, J.; GACITUA, H.; PETTIT, M.T.; ARAV, A. Directional freezing of equine semen in large volumes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.610-615, 2007.

SILVA, L.D.M. Avanços na inseminação artificial na espécie canina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v 24, n 4, p 194-201, 2000.

SILVA FILHO, J.M. 1994. **Tese de Doutorado**. Aspectos do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial de égua. 408p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

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

SNOECK, P.P.N. 2003. **Dissertação de Mestrado**. Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

SNOECK, P.P.N.; HENRY, M.; MELO, M.I.V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.56-64, 2007.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J. E. Cooled and frozen stallion semen. Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, **Colorado State University Bulletin** n.9, 1999.

STOREY, B.T.; NOILES, E.E.; THOMPSON, K.A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**. V37, p 46-58, 1998.

TROEDSSON, M.H.T.; LIU, I.K.M.; CRABO, B.G. Sperm transport and survival in the mare. **Theriogenology**, 49: 905-915, 1998.

VIANNA, B.C. 2000. **Dissertação de Mestrado**. Inseminação Artificial em éguas com sêmen congelado, “in natura” e diluído. Curitiba: Universidade Federal do Paraná.

VIDAMENT, M.; YVON, J.M.; COUTY, I.; ARNAUD, G.; INGUEKAM-FEUGANG, J.; NOUE, P.; COTTRON, S.; LE TELLIER, A.; NOEL, F.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. **Animal Reproduction Science**, v. 68 p.201-218, 2001.

VISKANTA, R.; BIANCHI, M.V.A.; CRITSER, J.K.; GAO, D. Solidification processes of solution. **Cryobiology**, v.34, p.348-362, 1997.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane solute water systems. **Cryobiology**, v.39, p.103-129, 1999.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v54, p579-585, 2000.

ZIMMERMANN, M. F.; FARINASSO, A.; MELO, C.M.; PAPA, F.O.; NEVES, J.P. Sobrevida das células espermáticas equinas criopreservadas após descongelação e diluição utilizando-se dois diluentes comerciais. **Ciência Animal Brasileira**, v10, n 1, p238-235, 2009.

ZÚCCARI, C.E.S. 1998. **Tese de Doutorado**. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina. 121p. Botucatu, SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

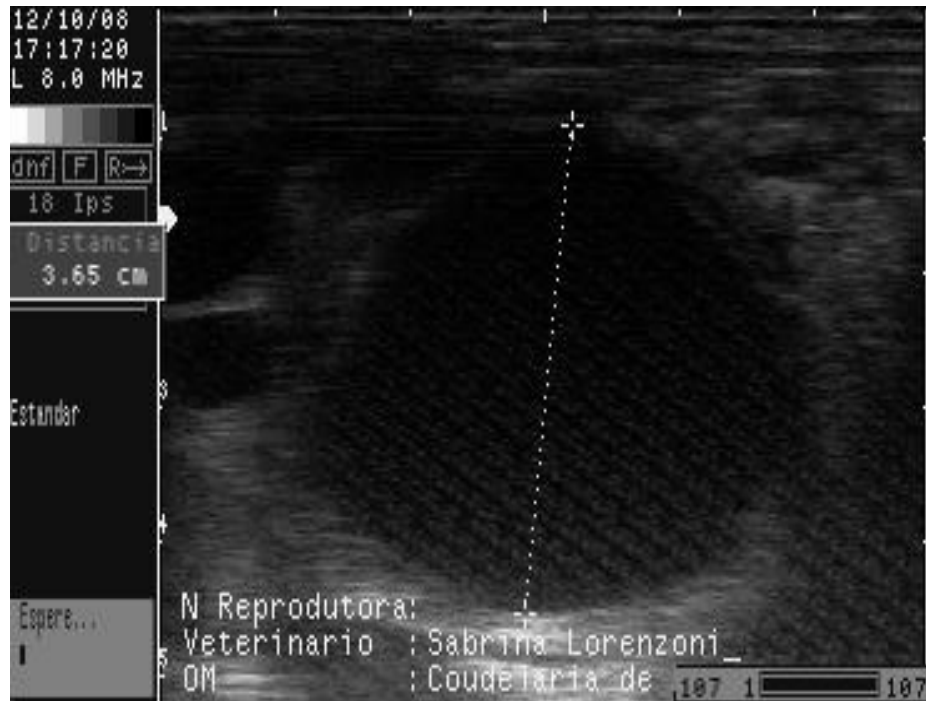
APÊNDICE I: Criotubo 2ml.



APÊNDICE II: Aparelho de ultrassonografia utilizado para o acompanhamento da dinâmica folicular.



APÊNDICE III: Controle folicular através de ultrassonografia.



APÊNDICE IV: Inseminação artificial.



APÊNDICE V: Potro nascido de inseminação artificial com criotubo.



APÊNDICE VI: Potro nascido de inseminação artificial com criotubo.



APÊNDICE VII: Potro nascido de inseminação artificial com criotubo.



APÊNDICE VIII: Avaliação dos defeitos espermáticos com sêmen fresco referente aos garanhões utilizados no experimento.

Garanhão	Defeitos espermáticos	Defeitos espermáticos
	maiores (%)	menores (%)
	χ	χ
A	13,3	8,6
B	10,0	9,6
C	11,3	9,3
D	6,6	6,0
E	6,0	4,6
F	5,3	4,6

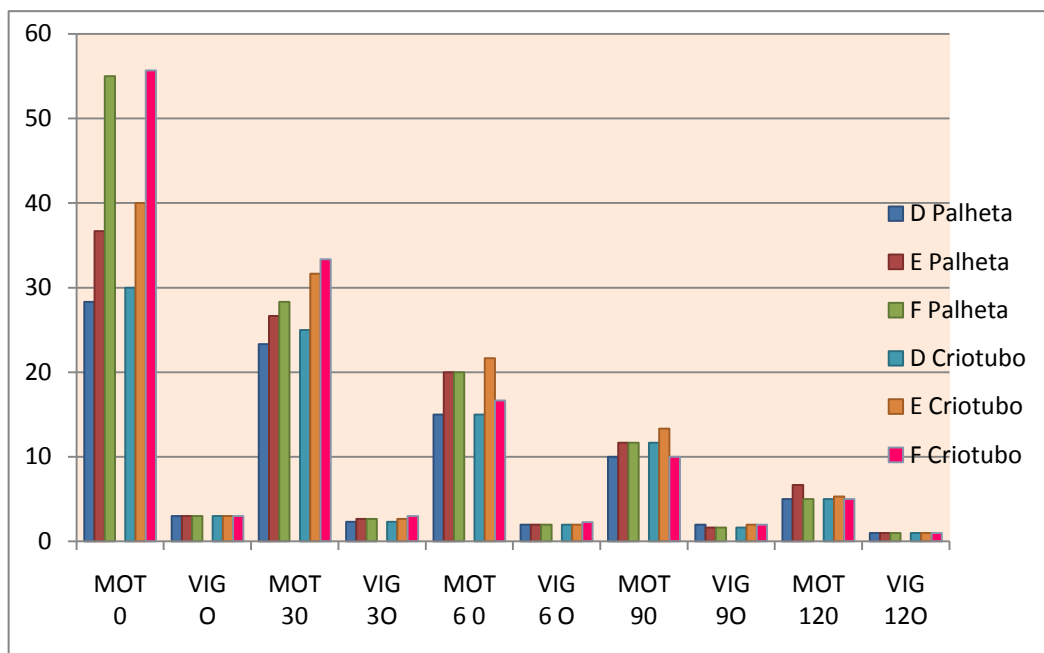
APÊNDICE IX: Avaliação dos defeitos espermáticos, pós descongelamento, do sêmen resfriado e não resfriado referente aos ganhões A, B e C.

Gar	Dil	Sêmen resfriado		Sêmen não resfriado	
		Def menores (%) χ	Def maiores (%) χ	Def menores (%) χ	Def maiores (%) χ
A	INRA	11,0	14,0	16,0	14,6
	Nagase	10,6	12,6	17,3	11,3
B	INRA	11,3	11,0	13,3	11,0
	Nagase	12,0	10,0	13,3	11,6
C	INRA	11,3	12,6	13,6	12,0
	Nagase	11,3	12,0	12,6	12,0

APÊNDICE X: Avaliação dos defeitos espermáticos, pós descongelamento do sêmen envasado em criotubo ou palheta, referente aos ganhões D, E e F.

Gar	Palheta		Criotubo	
	Def menores (%) χ	Def maiores (%) χ	Def menores (%) χ	Def maiores (%) χ
D	12,66	13,33	12,66	12,00
E	10,66	11,33	10,00	10,66
F	12,66	12,00	9,33	11,33

APÊNDICE XI: Gráfico com os resultados médios do teste de termorresistência, referente à motilidade (%) e ao vigor espermático (0-5), do sêmen envasado em palhetas ou criotubo (garanhões D, E e F).



P238

Immunocytochemical localization of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in preovulatory and in vitro matured horse oocytes related to prepuberty and different weight breeds

Lange Consiglio, A^{1*}, Arrighi, S², Bosi, GP², Aralla, MP, Cremonesi, F²
¹Veterinary Clinical Sciences, Reproduction Unit, University of Milano, Faculty of Veterinary Medicine, Italy; ²Department of Veterinary Science and Technologies, University of Milano, Faculty of Veterinary Med, Italy

The onset of puberty in humans and animals is associated with an increase in fat and consequent increase in circulating leptin, suggesting that leptin may be required for normal growth and development of reproductive organs. Moreover, leptin amount in the blood is proportional to body energy stores and/or body mass, so, inadequate nutrition might impair reproductive function leading, for example, to the delayed onset of puberty. A similar relationship between nutrition and reproductive efficiency is not understood in the mare where, besides many reports quantifying the correlation of circulating concentration of leptin with body condition scores, only few informations exist: about the presence of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in the ovary or in the oocyte. Taking this into account, we carried out an immunocytochemical study to investigate the presence of Ob and Ob-R in compact cumulus oocytes recovered from fillies and from mares of light or heavy body weight breeds after slaughtering during the autumnal transition. The occurrence of immunofluorescence was determined by scanning laser confocal microscopy in oocytes immediately upon collection and after in vitro maturation (IVM) using monoclonal antibody conjugated to a fluorescent label. IVM was accomplished in TCM199 supplemented with 1 mM pyruvate, 0.1 IU LH, 0.1 IU FSH, 100 ng IGF, 50 ng EGF, 1 µl ITS and 1 µl estrogen per ml. Oocytes were incubated for 40 h at 38°C at 5% CO₂. Both Ob and Ob-R, detected in immature oocytes of all kinds of animals analyzed, were uniformly distributed throughout the ooplasm, but the intensity of reaction was lower either in light weight mares or in fillies oocytes, than in oocytes of heavy weight mares. After IVM, heavy breed mares had a higher proportion of oocytes that reached metaphase II than light mares and fillies (35.53±2.71%, 19.84±1.48% and 15.82±1.52 respectively; P<0.05). In matured oocytes both Ob and Ob-R were localized to the oocyte cortex and concentrated at one pole of the oocytes. This distribution within the oocytes was independent from animal group and once again with lower intensities in light mares and in fillies. The results of the present study support the hypothesis that, also in the horse, leptin is differently localized during oocytes IVM showing diverse immunoreaction intensity related to the kind of horse breed and to the reproductive pubertal development. Moreover, leptin may be involved in the determination of the animal pole of the oocyte and in the establishment of the inner cell mass and trophoblast in the embryo.

P239

Equine semen cryopreservation using previously cooled sperm diluted with two different extenders

Lorenzoni, SI G^{*}; Zarabanda, YP; Faria, MR; Silva, AEF; Silva, DS and Rodrigues, JL

Laboratory of Embryology and Biotechnics of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Introduction Frozen stallion semen is commonly associated with poor quality and decreased pregnancy rates as compared with those produced during normal mating or with cooled semen techniques. The aim of this experiment was to investigate the progressive motility of stallion spermatozoa after previous cooling and freezing using INRA82 or a lactose egg-yolk based semen extender in presence of two glycerol concentrations.

Material and Methods During October 2007 nine ejaculates from 3 stallions obtained by artificial vagina with sperm progressive motility higher than 70% were used in the experiment. After each semen collection, the ejaculate was initially evaluated for total volume, gel-

free volume, sperm concentration and progressive motility. First the semen was diluted (1:2) using a modified Kenney extender, after that transferred into 8 plastic conical tubes, and then centrifuged at 400 x g during 10 min. The supernatant of each tube was removed and the pellets were resuspended with one of the following extenders: E1 = INRA82 + 4% glycerol; E2 = INRA82 + 5% glycerol; E3 = 11% lactose + 20% egg-yolk + 4% glycerol; E4 = 11% lactose + 20% egg-yolk + 5% glycerol, adjusting the sample concentration to 200 X 10⁶ spermatozoa/mL. After that, the resuspended semen from each extender was loaded in 8 straws (0,5 mL), from which 4 were immediately frozen (F) by exposure to liquid nitrogen vapor during 15 min and finally stored into liquid nitrogen. The remaining four straws were cooled (PC) from room temperature (+24°C) at 0,25°C/ min to 5°C. After holding the straws during 15 min at 5°C they were submitted to the same freezing treatment as described above. All sperm samples were thawed at 37°C during 30 seconds and progressive motility was immediately assessed. Data were analyzed via analyses of variance and T- Student test. Results: The sperm samples subjected directly to the freezing process showed immediately after thawing the following progressive motility: FE1: 29.44%; FE2: 26.67%; FE3: 27.22% and FE4: 24.44%. The post thawing progressive motility of the samples submitted to previous cooling before freezing was: PCE1: 43.89%; PCE2: 43.33%; PCE3: 44.44% and PCE4: 41.11%.

Conclusion The data showed that the previously cooled sperm samples resulted in significantly higher spermatozoa progressive motility rates after thawing (P<0.05), when compared with those directly frozen. There were neither differences in the observed spermatozoa progressive motility rates among the extenders nor among the glycerol concentrations.

P240

Characterization of pre-ovulatory uterine environment in mares

Melo, CM^{*}; Papa, FC; De Vla, B; Zanh, FS; Dell'Aqua Jr., JA; Alvarenga, MA
Faculty of Veterinary Medicine, São Paulo State University, Botucatu-Brasil

Introduction Healthy uterine environment offers ideal conditions to sperm transport to fertilization site and subsequent embryo development. Uterine fluid is important to sperm capacitation, fertilization, embryo development and the beginning of gestation and also contains substances responsible for immune defense, as chemoattractants and immunoglobulins. The aim of the present study was to evaluate uterine environment of mares at pre-ovulatory period.

Material and methods Twenty-five samples were collected from mares at Animal Reproduction and Radiology Department and at Lageado Farm from FMVZ - UNESP/Botucatu. Rectal ultrasonographic examinations were made, and if corpus luteum was detected, estrus was induced with prostaglandin. Samples were collected when mares presented a 35mm follicle, associated to uterine edema grade II-III. Uterine swabs for antibiogram were collected, followed by samples for uterine cytology. Uterine swabs were maintained in Stuart medium, cultured on ovine blood agar (5%) and MacConkey agar, then maintained under anaerobic conditions at 37°C for 72 hours. A cotton tampon (o.b.®-Johnson&Johnson) was introduced into uterine body and maintained for one hour in order to obtain uterine fluid (UF). After this period, tampons were removed with a 20mL syringe then compressed and the resultant UF was transferred to 15mL tubes. Immediately after collection, pH and osmolarity of UF were evaluated. Mares were separated into two groups - normal and endometritis - according to the results of microbiologic culture and uterine cytology. Values of UF volume, pH, osmolarity and percentage of neutrophils were analyzed by ANOVA, followed by T test.

Results and discussion Uterine fluid volume, pH and osmolarity were similar: between groups (3,42 vs 4,6; 7,62 vs 7,62 and 281,13 vs 285,8, respectively for normal and endometritis mares). However, the percentage of neutrophils on uterine cytology was higher on mares with endometritis than on normal mares (29,4 vs 1,46%, p<0,001).

Conclusion As the present results evidenced no differences on pH and osmolarity between normal and endometritis mares, but did evidence an increased number of neutrophils inside the uterus of

ANEXO II: Pôster apresentado em Gramado, no Rio Grande do Sul, no International Symposium Stallion Reproduction em 2008, sobre a segunda etapa do experimento. Abstract publicado na revista *Animal Reproduction Science*.

28

Abstracts / Animal Reproduction Science xxx (2008) xxx-xxx

Further work could lead to means of both inhibiting or stimulating sperm motility in a clinical setting.

Acknowledgements

The authors acknowledge support from the NIH/Merck Summer Research Training Program and the University of Pennsylvania Research Foundation Award.

doi:10.1016/j.anireprosci.2008.05.105

27

Progressive post-thaw motility of stallion spermatozoa loaded in cryovials

S.L.G. Lorenzoni*, R. Rodrigues, D.S. Silva, A.E.F. Silva, M.F. Bonini, J.L. Rodrigues

Laboratory of Embryology and Biotechnics of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501-970-Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail address: sabrina.l.g@hotmail.com (S.L.G. Lorenzoni).

Cryopreservation of stallion semen still is a challenge for reproductive biologists. The use of frozen semen allows the multiplication of breeding capacity of stallions, and at the same time the organization of semen banks. Most equine breed associations permit the use of frozen semen, and despite some barriers frozen semen inseminations are increasing. This experiment was designed to determine the post-thaw motility of sperm loaded into cryovials (2.0 mL), containing the usual volume of the intrauterine insemination dose. During November 2007 at the Coudelaria de Rincão, Brazilian Army horse breeding farm, three ejaculates were collected by artificial vagina from three Brasileiro de Hipismo stallions. The ejaculates were evaluated for total volume, gel-free volume, sperm concentration and progressive motility, with only ejaculates with sperm progressive motility of >70% being used in the experiment. First, semen was diluted (1:2) using a modified Kenney extender, transferred into 8 plastic conical tubes (Corning—12 mL) and then centrifuged at $400 \times g$ for 10 min. Following supernatant removal, pellets were resuspended in an extender containing 11% lactose, 20% egg yolk and 5% glycerol to a concentration of 200×10^6 spermatozoa/mL. Then, the diluted semen was either loaded into straws (0.5 mL) or cryovials (2.0 mL) and immediately cooled from room temperature (+24 °C) at 0.25 °C/min to 5 °C. After holding for 15 min at 5 °C, straws and cryovials were exposed to liquid nitrogen vapor for 15 min to be finally plunged into liquid nitrogen. Straws were thawed at 37 °C for 30 s and cryovials at 50 °C for 100 s. Immediately after thawing, the progressive sperm motility of the samples was determined by light microscopy. Data were analyzed by analyses of variance in a split-plot design and *T*-test. The motility analysis following thawing showed similar progressive sperm motility between semen samples loaded either in straws or in cryovials: stallion 1: 28.3% vs. 30.0%; stallion 2: 36.7% vs. 40.0%; stallion 3: 55% vs. 56.7%, for straws vs. cryovials, respectively. The use of cryovials provided similar progressive sperm motility after thawing when compared to the results observed with the sperm samples loaded into straws.

doi:10.1016/j.anireprosci.2008.05.106

ANEXO III: Ficha técnica do criotubo utilizado no experimento, extraído do site www.brand.de.



Cryogenic tubes

Designed for storage of biological material, such as microorganisms, human and animal cells, etc. in the gaseous phase of liquid nitrogen.

PP (Polypropylene for high chemical resistance, e.g., DMSO, phenol, chloroform), graduated

Outer-Ø 12.5 mm

Large frosted marking area and colored cap inserts for easy sample identification

Temperature stability to -196 °C

γ-ray sterile (SAL 10⁻⁶) and autoclavable at 121 °C (2 bar), acc. DIN EN 285.

Marked with the CE symbol according to the IVD Directive 98/79 EC

Tubes without ring stands can be centrifuged at up to an RCF of 14000.