

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**EFEITO DE EXTENSORES COMERCIAIS SOBRE A
VIABILIDADE ESPERMÁTICA APÓS-DESCONGELAMENTO
DE SÊMEN DE CAVALOS DA RAÇA PANTANEIRA**

Autora: Denise Senna

Orientadora: Profa. Dra. Regina Celia Rodrigues da Paz

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Keiko Hatamoto Zervoudakis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Sanidade Animal, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

**CUIABA – MT
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Dedico este trabalho aos meus pais, Senna e Manoela pelo amor, paciência, dedicação e suporte emocional nesta jornada.

Aos meus padrinhos, João e Dio, por me acolherem em sua casa como se fossem meus pais dando todo amor e atenção a esta etapa da minha vida.

Aos meus irmãos Roberto e Rogério pelo apoio e carinho que ofereceram nas horas das dúvidas e minha sobrinha Izabelle por dar mais alegria na minha vida.

As minhas “irmãs” Sâmara, Luana e Beatrice, pelo apoio e compreensão pela minha ausência nas ocasiões especiais.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Regina Celia Rodrigues da Paz, por ter aceitado o desafio de me orientar e tendo toda a dedicação, paciência e apoio nesta jornada.

Ao Dr. Frederico O. Papa e Dr. Alexandre F. Ramos que prontamente me ajudaram com a doação do material para o experimento.

Ao Prof. Dr Luciano Nakasato e Prof. Dr. Edson Moleta por me emprestarem o botijão de nitrogênio, o freezer e o equipamento fotográfico, e a Prof^a. Dr^a. Luciana Keiko por ceder o laboratório e seus equipamentos.

Aos meus padrinhos, João e Dio, juntamente com seus filhos Junior e Eduardo por me acolher na sua casa, utilizar sua fazenda, seus funcionários e seus animais para este projeto.

A todos os criadores, Dr. Evandro Borba, Dr Luiz Rodolfo G. P. Barros, Sr. Mardio Almeida Lobo e ao Sr. Oacy Correia de Almeida Lobo que me “emprestaram” seus reprodutores para este estudo.

Ao Sr. Rubens Antonio N. Junior e sua equipe por ter doado seu tempo na construção do manequim.

A minha amiga e colega Nely P. Souza por ter me ajudado nas partes “burocráticas” da dissertação.

Aos funcionários Cacioney, Luiz, Paraná e Fred, pois sem vocês para fazer o manejo dos garanhões não teria finalizado este projeto.

E a Deus por ter me dado saúde, força, determinação e respostas as todas as minhas duvidas, indicando sempre o melhor caminho.

Muito Obrigada a todos que de algum modo contribuíram para que este projeto tenha se tornado realidade.

RESUMO

Efeito de extensores comerciais sobre a viabilidade espermática após-descongelamento de sêmen de cavalos da raça Pantaneira

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes extensores (T1= Botu sêmen®; T2= Equimix®; T3= Max sêmen®; T4= Max sêmen plus®; T5= FR1® e T6= FR4®.) após congelamento do sêmen de cavalo Pantaneiro utilizando Botu - Crio ® pela avaliação da motilidade (%), vigor (0-5), concentração (cel/mL), anormalidade espermática (%) e integridade de acrossoma (%). Para a realização deste trabalho foram utilizados quatro ejaculados de cinco garanhões da raça Pantaneira. Para colheita de sêmen foi utilizada vagina artificial com manequim ou égua no cio. A avaliação do sêmen a fresco apresentou a média de motilidade $79,50 \pm 9,95\%$; vigor $3,8 \pm 0,27$; concentração $464,19 \pm 452,18 \times 10^6/\text{mL}$; anormalidade espermática $12,74 \pm 3,86\%$ e integridade de acrossoma $97,19 \pm 1,39\%$. O sobrenadante recuperado após diluição 1:1 e centrifugação do sêmen a fresco nos diferentes extensores apresentou os seguintes resultados quanto a motilidade e vigor nos diferentes tratamentos: T1, $24,65 \pm 20,29\%$; $2,15 \pm 0,84$; T2, $40,55 \pm 17,78\%$; $2,65 \pm 0,52$; T3, $30,05 \pm 20,24\%$; $2,20 \pm 0,60$; T4, $40,25 \pm 30,85\%$; $2,40 \pm 1,07$; T5, $19,75 \pm 13,67$; $1,65 \pm 0,70$ e T6, $32,00 \pm 23,44\%$ e $1,95 \pm 1,11$. Os valores obtidos após o descongelamento nos seguintes tratamentos quanto motilidade, vigor, patologia e integridade de acrossoma foram respectivamente T1, $44,25 \pm 12,89\%$; $3,15 \pm 0,28$; $8,95 \pm 4,63\%$ e $95,87 \pm 4,33\%$; T2 $41,75 \pm 15,95\%$, $2,95 \pm 0,32$; $9,47 \pm 5,78\%$ e $96,05 \pm 3,46\%$; T3 $42,50 \pm 11,69\%$; $3,10 \pm 0,14$; $9,12 \pm 4,93\%$ e $96,75 \pm 2,92\%$; T4 $49,25 \pm 13,77\%$; $3,15 \pm 0,22$; $9,15 \pm 5\%$ e $95,72 \pm 5,13\%$; T5 $42,05 \pm 11,06\%$; $2,95 \pm 0,37$; $9,52 \pm 5,45\%$ e $95,30 \pm 5,58\%$; e T6 $41,50 \pm 9,66\%$; $3,0 \pm 0,18$; $8,45 \pm 6,08\%$ e $95,20 \pm 5,53\%$. Para análise estatística foi utilizado o Teste de Tukey a 5%, que comprovou não haver diferença estatística entre os tratamentos estudados. Diante dos resultados encontrados concluímos que para a raça Pantaneira todos os extensores comerciais testados mostraram ser satisfatório e podem ser usados para o congelamento de sêmen nesta espécie.

Palavras-chave: Reprodução, sêmen, extensor, cavalo Pantaneiro, criopreservação.

ABSTRACT

Commercial extenders effect on post thawing sperm viability of Pantaneira horse semen.

The objective of this study was to evaluate the influence of different extenders (T1 = Botu semen ® T2 = Equimix ®, T3 = Max ® semen, T4 = Max semen plus ®, T5 = ® FR1 and FR4 = T6 ®.) according motility (%), vigour (0-5), concentration (cells / mL), anormality (%) and acrosome integrity (%). Four animals was used for semen collection (n=4) using artificial vagina phantom or mare in heat. Means of fresh semen evaluation was $79.50 \pm 9.95\%$ motility; 3.8 ± 0.27 vigour; $464.19 \pm 452.18 \times 10^6/\text{mL}$ concentration; $12.74 \pm 3.86\%$ anormality and $97.19 \pm 1.39\%$ acrosome integrity. The supernatant recovered after fresh semen dilution (1:1) and centrifugation in different extenders showed the following results according motility and vigour: T1, $24.65 \pm 20.29\%$; 2.15 ± 0.84 ; T2, $40.55 \pm 17.78\%$; 2.65 ± 0.52 ; T3, $30.05 \pm 20.24\%$; 2.20 ± 0.60 ; T4, $40.25 \pm 30.85\%$; 2.40 ± 1.07 ; T5, 19.75 ± 13.67 ; 1.65 ± 0.70 and T6, $32.00 \pm 23.44\%$ and 1.95 ± 1.11 . The values obtained after thawing according motility, vigour, morphology and acrosome integrity were respectively: T1 $44.25 \pm 12.89\%$; 3.15 ± 0.28 ; $8.95 \pm 4.63\%$ and $95.87 \pm 4.33\%$; T2 $41.75 \pm 15.95\%$, 2.95 ± 0.32 ; $9.47 \pm 5.78\%$ and $96.05 \pm 3.46\%$; T3 $42.50 \pm 11.69\%$; 3.10 ± 0.14 ; $9.12 \pm 4.93\%$ and $96.75 \pm 2.92\%$; T4 $49.25 \pm 13.77\%$; 3.15 ± 0.22 ; $9.15 \pm 5\%$ and $95.72 \pm 5.13\%$; T5 $42.05 \pm 11.06\%$; 2.95 ± 0.37 ; $9.52 \pm 5.45\%$ e $95.30 \pm 5.58\%$; and T6 $41.50 \pm 9.66\%$; 3.0 ± 0.18 ; $8.45 \pm 6.08\%$ and $95.20 \pm 5.53\%$. For statistical analysis we used the Tukey test at 5%, which demonstrated no statistical difference between treatments. With this results we can conclude that all commercial extender can be used for semen criopreservation in Pantaneiro horse.

Key-words: Reproduction, sêmen, extender, Pantaneiro horse, criopreservation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Garanhões da raça Pantaneira utilizados no experimento.....	28
Figura 02 – Garanhão saltando no manequim.	29
Figura 03 – Treinamento do garanhão para coleta em manequim: Monta em égua em estro (a); Reconhecimento do manequim com urina de égua em estro pelo reflexo de Fleming (b); Garanhão saltando no manequim (c); Coleta de sêmen com vagina artificial (d).....	30
Figura 04 – Égua contida em estro induzido (a); Coleta de sêmen em égua em estro induzido (b).....	30
Figura 05 – Espermatozóide com acrossoma íntegro (a). Espermatozóide com acrossoma lesado (b).....	32
Figura 06 – Extensores comerciais 1 = Botu sêmen®; 2 = Equimix®; 3 = Max sêmen®; 4 = Max sêmen plus®; 5 = FR1® e 6= FR4®. O BC = Botucricio®.....	33
Figura 07 – Centrifuga e tubos identificados conforme o tratamento.....	34
Figura 08 – Palhetas identificadas conforme o animal, data e tratamento.....	34
Figura 09 – Banho – maria (FANEM® - Model 1100).....	35
Figura 10 – Placa aquecedora (Master Digital AS 300).....	35
Figura 11 - Alíquota do sêmen diluída em formol salino conforme o tratamento.....	36

- Figura 12 – Média da motilidade espermática de sêmen de Cavalos Pantaneiros em cada tratamento apos diluição e centrifugação, Poconé, Mato Grosso, 2009.....39
- Figura 13 - Média do vigor espermático de sêmen de Cavalos Pantaneiros em cada tratamento apos diluição e centrifugação, Poconé, Mato Grosso, 2009.....39
- Figura 14 - Média da motilidade, vigor, morfologia espermática e integridade de acrossoma de sêmen de Cavalos Pantaneiros em cada tratamento após o descongelamento, Poconé, Mato Grosso, 2009.....40
- Figura 15 - Média da motilidade, vigor, morfologia espermáticas e porcentagem de acrossomas íntegros de sêmen de Cavalos Pantaneiros antes e após o congelamento. Poconé, Mato Grosso, 2009 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Situação de risco de extinção de uma raça segundo FAO (2000)	16
Tabela 2 – Média e desvio padrão do volume total, motilidade, vigor, concentração, morfologia espermáticas e integridade de acrossoma de sêmen a fresco de Cavalos Pantaneiros, Poconé Mato Grosso, 2009	37
Tabela 3 – Média e desvio padrão dos defeitos maiores encontradas no sêmen a fresco de Cavalos Pantaneiros, Poconé, Mato Grosso, 2009.....	38
Tabela 4 – Média e desvio padrão dos defeitos menores encontradas no sêmen a fresco de Cavalos Pantaneiros, Poconé, Mato Grosso, 2009.....	38
Tabela 5 – Média e desvio padrão dos defeitos maiores encontradas no sêmen após descongelamento de Cavalos Pantaneiros, Poconé, Mato Grosso, 2009.....	41
Tabela 6 – Média e desvio padrão dos defeitos menores encontradas no sêmen após descongelamento de Cavalos Pantaneiros, Poconé, Mato Grosso, 2009.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

ABCCP – Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Pantaneiros

P1 – Eqüino Pantaneiro 1

P2 – Eqüino Pantaneiro 2

P3 – Eqüino Pantaneiro 3

P4 – Eqüino Pantaneiro 4

P5 – Eqüino Pantaneiro 5

RG – Registro Genealógico

T1 – Tratamento 1 Botu sêmen®

T2 – Tratamento 2 Equimix®

T3 – Tratamento 3 Max sêmen®

T4 – Tratamento 4 Max sêmen plus®

T5 – Tratamento 5 FR1®

T6 – Tratamento 6 FR4®

mL – mililitro

DNA - ácido desoxirribonucléico

°C – grau Celsius

mm³ - milímetro cúbico

cm³ - centímetro cúbico

cm - centímetro

mg - miligrama

µl – microlitro

g - força gravitacional

DP – desvio padrão

DMF - dimetil-formamida

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

F.A.O – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação

ÍNDICE

CAPITULOS	PAGINAS
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE ILUSTRAÇÃO.....	7
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISAO BIBLIOGRAFICA.....	14
2.1 Cavalo Pantaneiro.....	14
2.2 Coleta do ejaculado.....	15
2.3 Avaliação do ejaculado.....	16
2.4 Princípios da criopreservação.....	17
2.4.1 Extensores.....	19
2.4.2 Centrifugação	20
2.4.3 Plasma Seminal.....	21
2.4.4 Crioprotetores.....	22
2.4.5 Envasamento.....	25
2.4.6 Congelamento.....	25
2.4.7 Descongelamento.....	26
3. MATERIAL E METODO.....	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Coleta do sêmen.....	29
3.3 Avaliação do sêmen.....	31
3.4 Congelamento do sêmen	32
3.5 Descongelamento do sêmen	35
3.6 Análise Estatística.....	36

4.RESULTADOS.....	37
4.1 Avaliação Morfofisiológica do sêmen a fresco colhido em vagina artificial....	37
4.2 Avaliação de Motilidade e Vigor espermático após diluição e centrifugação nos diferentes tratamentos	39
4.3 Avaliação Morfofisiológica do sêmen após descongelamento.....	40
5.DISSCUSSÃO.....	43
6.CONCLUSÃO.....	48
7.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

A raça Pantaneira, oriunda da Península Ibérica, adaptou-se muito bem às condições ambientais do Pantanal. Estes animais foram submetidos a um longo processo de seleção natural ocorrida por mais de quatro séculos, o qual lhes proporcionou grande potencial adaptativo à região (SANTOS et al, 2003; ZUCCARI et al, 2004; SILVA et al, 2005).

Considerando o alto valor genético da raça Pantaneira, aumenta a ênfase no papel de conservação da mesma, sendo os principais métodos de conservação da raça Pantaneira o armazenamento criogênico de sêmen e a manutenção de um banco de DNA, bem como a manutenção de animais vivos (SANTOS et al, 2003).

O desenvolvimento de novas técnicas para a criopreservação do sêmen é um dos passos de maior importância para a preservação da espécie (PAPA et al, 2002). Porém, nenhum protocolo ou diluente permite que o sêmen eqüino congelado tenha a mesma qualidade e fertilidade do sêmen a fresco, devido à variação individual frente à criopreservação e o baixo rendimento de doses por ejaculado (PAPA et al 2002; ZUCCARI et al., 2004; BLANES et al, 2005; ALVARENGA e CARMO, 2007; SNOECK et al, 2007).

Com o objetivo de melhorar a fertilidade do sêmen congelado eqüino, diversos crioprotetores têm sido estudados (JULIANI et al, 2007; JULIANI et al, 2009; OSORIO, 2006).

A utilização do sêmen congelado é uma das formas de conservar, aumentar e melhorar geneticamente a raça além de diminuir os riscos de propagação de doenças e facilitar a troca genética entre animais de diferentes localidades.

Este estudo teve como objetivo avaliar o melhor extensor para congelamento de sêmen nesta espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Cavalo Pantaneiro

O cavalo Pantaneiro é um mosaico racial, originariamente resultante de dois troncos primitivos étnicos: "Equus Caballus Asiaticus" e o "Equus Caballus Africanus". Formou-se no estado do Mato Grosso com características próprias adquiridas durante 4 séculos de aclimatação ao meio complexo e diversificado que é o Pantanal Mato-grossense. Desde a implantação de fazendas no Pantanal, este animal tem sido importante para a lida do gado e como meio de locomoção para os habitantes da região (MISERANI et al., 2002; ZÚCCARI et al., 2002; SANTOS et al., 2003). Neste ambiente, o único cavalo que suporta extensas marchas e o manejo diário com o gado é o Pantaneiro (MISERANI et al., 2002; ZÚCCARI et al., 2002; SILVA et al., 2005). Informações esparsas sobre a raça começaram a ser publicadas no final da década de 50 por Domingues (1957) até meados da década de 70 por Corrêa Filho (1973).

Este ecótipo quase chegou à extinção devido a vários fatores como doenças (Anemia Infecciosa Eqüina, tripanossomose e babesiose) e cruzamentos indiscriminados com outras raças para aumentar seu porte. Além disso, observou-se que os melhores animais da raça Pantaneira eram castrados e utilizados nos trabalhos das fazendas, deixando a paternidade para os animais inferiores. Graças ao trabalho da Associação Brasileira de Criadores do Cavalo Pantaneiro (A.B.C.C.P.) e outras instituições, esta raça não foi extinta (MISERANI et al., 2002; ZÚCCARI et al., 2002; SANTOS et al., 2003; SANTOS et al., 2004).

Atualmente, a A.B.C.C.P. conta com cerca de 4.800 éguas e 850 reprodutores registrados em livro definitivo, numa proporção égua: garanhão de cerca de 5:1. Esse número teve um aumento significativo nos últimos anos e a raça que estava em situação de "vulnerável" está passando para situação de "raro" (SANTOS et al., 2004). No entanto a raça ainda necessita de programas específicos para a sua conservação (MISERANI et al., 2002; ZÚCCARI et al., 2002; SANTOS et al., 2003; SANTOS et al., 2004).

A situação de ameaça de uma raça pode ser determinado pelo número de fêmeas em reprodução, pela proporção macho: fêmea ou pelo tamanho efetivo da população. De acordo com especialistas da FAO (2000), o “status” de risco de uma raça é definido em função do número de fêmeas em reprodução (Tabela 1).

Tabela 1 – Situação de risco de extinção de uma raça segundo FAO (2000).

Numero de fêmeas em reprodução	Status de risco
< 100	Critico
100 – 1000	Em perigo
1000 – 5000	Vulnerável
5000 - 10000	Raro

Os principais métodos de conservação do cavalo Pantaneiro têm sido os armazenamentos criogênicos de sêmen e a manutenção de um banco de DNA (conservação *ex situ*), bem como a manutenção de animais vivos (conservação *in situ*) (SANTOS et al, 2003). Publicações recentes têm demonstrado a existência de diferenças sazonais na qualidade do sêmen, obtendo-se uma maior motilidade do sêmen no mês de outubro (METCALF, 2007). Silva et al (2007) observaram melhor motilidade espermática em garanhões da raça Mangalarga Machador no período de julho a janeiro, porém Ribas et al (2007) observou que o cavalo Pantaneiro mantém a despeito da sazonalidade, condições fisiológicas que permitem uma boa qualidade seminal durante todo ano.

2.2. Coleta do ejaculado

Para criopreservação do sêmen eqüino são necessárias coletas diárias durante sete dias para se obter um equilíbrio das reservas extragonadais e assim obter um parâmetro mais próximo da produção espermática do garanhão (JASCKO,1994 apud OSORIO, 2006).

As coletas de sêmen podem ser realizadas com o auxílio de uma vagina artificial de fundo fechado modelo Hannover, ou com vagina artificial aberta cuja

principal finalidade é a colheita de sêmen fracionado, sendo indicada apenas em situações especiais. A água deve estar a temperatura de aproximadamente 40°C no momento da coleta (HAFEZ e HAFEZ, 2000).

Um manequim artificial ou vivo, pode ser utilizado na coleta do sêmen eqüino, necessitando apenas de treinamento prévio do garanhão. A utilização de égua em estro se faz necessário durante o treinamento, podendo com o tempo ser dispensada. O uso do manequim para coleta de sêmen é, sem dúvida, a maneira mais segura, tanto para os animais quanto para o homem (SILVA FILHO et al, 1999).

2.3 Avaliação do ejaculado

Após a coleta é importante que se realize a retirada do gel presente no ejaculado, uma vez que apresenta efeitos nocivos à célula espermática. O procedimento mais utilizado é a filtragem, a qual permite a retenção do gel, parte dos contaminantes bacterianos e também das sujidades presentes no sêmen. A filtragem pode ser realizada através do acoplamento de um filtro ao copo coletor de sêmen, ou imediatamente após sua coleta (SQUIRES et al., 1999 apud CANISSO et al., 2008).

Testes laboratoriais convencionais são usados para a avaliação dos espermatozóides, e incluem aspectos macroscópicos e microscópicos (MANUAL..., 1998; VARNER, 2008). Após a coleta a fração rica em espermatozóides é avaliada quanto aos aspectos macroscópicos incluindo volume, cor e aspecto, e microscópicos incluindo motilidade, morfologia espermática, vigor e concentração (MANUAL..., 1998; OSORIO, 2006; ARRUDA et al., 2007; ZIMMERMANN, 2007; VARNER, 2008). A qualidade do exame baseia-se em equipamentos confiáveis e pessoal qualificado. Mesmo quando estes são qualificados, a exatidão dos exames pode ser limitada (VARNER, 2008).

A motilidade diz respeito ao percentual de espermatozóides móveis numa amostra, enquanto o vigor refere-se à força de deslocamento, em uma escala de 0 a 5, onde 0 significa espermatozóides sem motilidade e 5, espermatozóides com deslocamento rápido e contínua progressão retilínea. Para determinação desses

parâmetros o método mais usual, porém menos preciso, é o da avaliação subjetiva em microscopia óptica, em aumento de 100 a 400 vezes (MANUAL..., 1998). A motilidade do espermatozóide é extremamente suscetível a condições ambientais como calor ou frio excessivo, uso de lubrificantes ou desinfetantes e luz, por isso é necessário proteger o sêmen dessas injúrias (VARNER, 2008)

A concentração representa o número de espermatozóides por milímetro (mm^3) ou centímetro cúbico (cm^3). O procedimento mais comum para se obter a concentração espermática consiste na contagem das células em câmara de Neubauer, podendo ainda ser utilizada a espectrofotometria e o *Micro-cell-counter* (MANUAL..., 1998). A concentração espermática pode apresentar variação entre raças, entre indivíduos de uma mesma raça, e até num mesmo animal, dependendo da frequência de utilização desse macho para reprodução (VIDAMENT et al., 1997).

Para avaliação das características morfológicas dos espermatozóides podem ser utilizados esfregaços corados ou preparação úmida avaliados em microscópio de contraste de fase. Métodos de coloração específicos podem ser utilizados para avaliação de porções específicas do espermatozóide, como por exemplo o acrossoma (MANUAL..., 1998).

Para a escolha do ejaculado visando o processo de congelamento é necessário que as características seminais estejam dentro dos parâmetros mínimos requeridos para a espécie eqüina, isto é, motilidade espermática maior que 70%, concentração maior que 60 milhões de espermatozóides por mL, vigor igual a 3 e anormalidade dos espermatozóides igual a 30% (MANUAL..., 1998; OSORIO, 2006; ZIMMERMANN, 2007).

2.4 Princípios da criopreservação

A criopreservação do sêmen eqüino representa uma importante ferramenta no melhoramento genético da espécie, pela maximização do uso de reprodutores superiores (ZUCCARI et al., 2004). Porém, alguns fatores impedem que o sêmen eqüino congelado possa ser utilizado em larga escala, dentre eles, a variação individual frente a criopreservação, o baixo rendimento de doses por ejaculado, custo com equipamento, mão de obra especializada e um local adequado para

manipular as amostras (ZUCCARI et al., 2004; MELO et al., 2005; MOORE et al., 2006; PAPA et al., 2005; MELO et al., 2008).

O processo de criopreservação do sêmen equino é um processo de grande estresse celular, o qual causa mudanças ultra-estruturais, físicas e químicas nas células espermáticas resultando em prejuízos na integridade e viabilidade espermática, assim como na fertilidade do sêmen congelado equino (GRAHAM, 1996; BALL et al., 2001; JOBIM et al., 2007; ZIMMERMANN, 2007; PUGLIESI et al., 2008). Segundo Keith (1998), durante o processo de criopreservação, o sêmen deve passar da temperatura corpórea à temperatura ambiente, o que parece não ocasionar danos aos espermatozoides quando este se encontra diluído em meio adequado.

O primeiro estresse térmico pelo qual os espermatozoides sofrem ocorre durante o processo de resfriamento da temperatura corporal de 37°C para 5°C (ALMEIDA, 2006). Isto se deve a fase de transição da membrana plasmática do estado líquido cristalina para a fase de gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS, 2002) podendo ocorrer perda de movimentos progressivos, alterações na membrana plasmática e acrossomal (OSORIO, 2006). Para que este efeito seja minimizado é necessário controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas 19°C e 8°C e adicionar lipídeos e lipoproteínas ao diluente, além de usar curvas de resfriamento lentas (- 0,05°C/min), pois se esta for feita de forma inadequada os espermatozoides sofrerão alterações nos padrões normais de motilidade, danos em seu metabolismo, na membrana plasmática e no acrossoma (GRAHAM, 1996; FARRAS et al., 2008).

Em temperaturas em torno de 5°C a água intra e extracelular permanece resfriada e não cristaliza, porém quando a temperatura do meio atinge entre -5°C e -10°C, cristais de gelo se formam, a partir da água pura no meio extracelular, porém protegido pela membrana plasmática o meio intracelular não se congela, (super resfriamento) (OSORIO, 2006; MELO, 2007). Neste ponto, a curva de congelamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico (MELO et al., 2005).

A desidratação e a perda de água pela célula são efeitos desejáveis, pois reduzem a probabilidade de formação de grandes canais de gelos dentro das mesmas, as quais causariam danos nas estruturas internas e/ou na membrana plasmática (GRAHAM, 1996).

Uma hiper desidratação promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula até ocorrer um colapso da membrana (MEDEIROS, 2002). Portanto, para evitar os efeitos nocivos da hiper desidratação celular e os efeitos da formação de cristais de gelo em excesso dentro da célula, é necessário o uso de curvas de congelamento que evitem ao máximo cada efeito nocivo (OSORIO, 2006; FÜRST et al., 2005). Neste caso, como o gelo extracelular descongela lentamente, diluirá lentamente o soluto das frações de água não congeladas, o que permite que a água se difunda lentamente para dentro da célula, diluindo o soluto intracelular até atingir a concentração inicial. Se o espermatozóide sofre uma hiper hidratação, o gelo derrete rapidamente diluindo o soluto do meio e a água entrará muito rapidamente no espermatozóide, o qual se encontra altamente concentrado, danificando o espermatozóide (GRAHAM, 1996; MOORE et al., 2006).

2.4.1 Extensores

Diversos extensores seminais têm sido utilizados para diluir e/ou preservar o sêmen eqüino. Os extensores seminais são meios enriquecidos com diferentes substâncias as quais oferecem um ambiente adequado aos espermatozoides para sua sobrevivência, e incluem gema de ovo, leite desnatado, produtos a base de leite ou produtos químicos para a regulação da osmolaridade e/ou pH (MASUDA et al., 2004; OSORIO, 2006; ZIMMERMANN, 2007; MIRO et al., 2009).

Leite ou extensores a base de leite são usados na rotina para a diluição, centrifugação, resfriamento e armazenamento ou estocagem do sêmen eqüino. O fracionamento do leite pelos diferentes métodos tem permitido a preparação das diferentes frações purificadas. Pode-se utilizar um extensor apenas com gema de ovo como fonte de lipoproteína, como o meio EDTA-Gema de ovo, ou uma combinação de gema de ovo e leite, como utilizado no extensor Institut de la Recherche Agronomique-France (INRA 82) (OSORIO, 2006). Estudos demonstraram que leite desnatado acrescido com glicose protege a integridade da membrana espermática, porém não mantém a motilidade (AKÇAY, 2008).

Os extensores mais comumente utilizados são os derivados de Kenney, que são compostos à base de leite em pó desnatado, glicose, penicilina e estreptomicina

(KENNEY et al., 1975). Leite desnatado em pó adicionado aos extensores tem efeitos benéficos sobre a sobrevivência dos espermatozoides em eqüinos 5°C e há uma redução nos componentes prejudiciais à membrana celular (FAYRER-HOSKEN et al., 2008; WEBB et al., 2009).

Os extensores mais utilizados para o processo de centrifugação são: citrato - EDTA, glicose – EDTA e lactose – EDTA (MELO et al., 2008). A utilização de extensor opaco INRA 96 (INRA 82 acrescido com gema de ovo 2%) para centrifugação, demonstrou melhora na motilidade dos espermatozoides em comparação ao extensor claro HGLL (solução salina balanceada) (WAITE et al., 2008). Experimento recente com o extensor Botu - sêmen® demonstrou ser melhor na proteção da viabilidade espermática quando comparado ao extensor Kenney modificado (MELO et al., 2008). Farras et al. (2008) utilizaram três diferentes extensores comerciais (Botu-Semen®, Botu-Turbo® e INRA 96®) para refrigeração e observaram no seu experimento que não houve diferença significativa entre os tratamentos, concluindo que os extensores foram eficazes na manutenção da motilidade e viabilidade espermática.

O Equimix® contém em sua composição: glicose, bicarbonato de sódio, leite desnatado e os antibióticos: penicilina e amicacina. O FR1® é composto por uma solução contendo açúcares e tampão HEPES®. O FR4® é uma solução não estéril a base de leite desnatado e gema de ovo sem a adição de crioprotetor. O Botu - sêmen® é composto por açúcares, leite desnatado e gema de ovo (NUTRICELL, 2009). O Max sêmen® e o Max sêmen Plus® são extensores para sêmen eqüino acrescidos de amicacina e penicilina (E.H.G., 2009).

2.4.2 Centrifugação

A centrifugação é uma etapa indispensável para o procedimento de congelação e tem as funções de eliminação do plasma seminal e de promoção da concentração dos espermatozoides (BRISCO et al., 2000; DELL'AQUA JR, 2000; WEBB et al., 2009).

O efeito da centrifugação na motilidade do espermatozoide eqüino é influenciado pela força e tempo de centrifugação, pela presença ou ausência de

extensor, bem como o tipo de extensor utilizado (BRISCO et al., 2000). Os efeitos deletérios da centrifugação podem ser minimizados com a utilização de extensores específicos para este fim (WAITE et al., 2008). A taxa de diluição, normalmente utilizado para centrifugação de sêmen eqüino é de 1:1 ou 1:2, sendo que a centrifugação resulta em uma taxa de recuperação de cerca de 75% dos espermatozoides no sedimento (MIRO et al., 2009). Melo et al. (2007), realizaram a centrifugação do sêmen após 24 horas de resfriamento em extensor Botu – sêmen® para posterior congelamento e não observaram efeito deletério no sêmen.

Forças de centrifugação muito alta têm demonstrado diminuir a motilidade dos espermatozoides, e forças de centrifugação muito baixas podem resultar em perda de espermatozoides após a remoção do sobrenadante (WEBB e DEAN, 2009).

Longos períodos de centrifugação, acima de 12 minutos, resultam em uma alta recuperação espermática, contudo predispõe as células a possíveis injúrias (DELL'AQUA JR., 2000). Centrifugação feita a 600 g por dez minutos apresentou recuperação espermática de 87% sem alterações significativas nos parâmetros espermáticos, tratando-se então, de intensidade e tempo recomendáveis (DELL'AQUA JR. e PAPA, 2001). Len et al. (2010), demonstraram que o sêmen eqüino centrifugado a 900 g ao contrario do tradicionalmente recomendado 400 g ou 600 g, por 10 minutos, não apresentou efeitos negativos, e obteve uma maior taxa de recuperação de espermatozoides.

Por outro lado a utilização de tubos cônicos ou de fundo em forma de “mamilo” para centrifugação resultou em uma alta recuperação de espermatozoides e manteve as funções espermáticas (WAITE et al., 2008; WEBB e DEAN, 2009)

2.4.3 Plasma Seminal

O plasma seminal é composto por enzimas, hormônios, metabólicos e substâncias que melhoram a qualidade espermática, ativando a motilidade espermática e protegendo os espermatozoides da oxidação reativa, contudo pode alterar a integridade do DNA espermático. No entanto parece ser essencial no acasalamento natural para transportar e proteger os espermatozoides (AKÇAY, 2008; ARRUDA et al., 2007; PAPA et al, 2008). A composição do plasma seminal

pode variar entre gananhões. Tal fato pode ser determinante na habilidade dos espermatozoides de um reprodutor em particular, em sobreviver ao processo da criopreservação (MOORE et al., 2002).

Atualmente o plasma seminal é removido completamente ou parcialmente durante o processo de congelamento, deixando aproximadamente 0-5% de seu volume original (MOORE et al., 2002; OSORIO, 2006; LEN et al., 2010). A remoção do plasma seminal é necessária para a sobrevivência da célula durante a criopreservação (BRISCO et al., 2000; MOORE et al., 2002; MIRO et al., 2009; LEN et al., 2010). Em contrapartida, a adição de plasma seminal durante a criopreservação demonstrou proteger os espermatozoides contra a peroxidação lipídica, em concentrações abaixo de 25% (ALMEIDA, 2006), porém a adição de 50% de plasma seminal foi prejudicial para motilidade (ARRUDA et al., 2008).

Os efeitos indesejáveis do plasma seminal podem ser reduzidos através da diluição de altas frações de extensores ao sêmen, por exemplo, 1:4 ou 1:19 (sêmen: extensor) (MIRO et al., 2009; WEBB e DEAN, 2009). Além disso, a remoção do plasma seminal por centrifugação demonstrou melhorar a recuperação da mobilidade e reduzir os danos ao DNA e acrossoma no processo de congelamento do sêmen (WEBB e DEAN, 2009).

2.4.4 Crioprotetores

Existe um grande interesse no desenvolvimento de técnicas que possam melhorar os índices de fertilidade em eqüinos, com a utilização de um pequeno número de espermatozoides, principalmente para a aplicação do sêmen congelado (LEÃO et al., 2004). Fatores limitantes à técnica de congelamento de sêmen na espécie eqüina estão relacionados ao custo dos equipamentos e preparação de diluentes adequados para congelação (MELO et al., 2008).

Os crioprotetores são classificados como penetrantes ou intracelulares (glicerol, etileno glicol, dimetil-formamida (DMF) e dimetil sulfóxido) e não penetrantes ou extracelulares (gema de ovo, leite, alguns açúcares e a albumina sérica bovina) (GRAHAM, 1996; KEITH, 1998; ARRUDA, 2000).

Os principais componentes dos meios diluidores são agentes tampões, água, carboidratos, antibióticos e crioprotetores. As lipoproteínas contidas no leite ou gema de ovo protegem os espermatozóides contra o choque térmico, os substratos, tais como glicose, trealose e rafinose, atuam como fonte de energia e como crioprotetores extracelulares; os tampões atuam protegendo contra mudanças de pH e os antibióticos como penicilina e estreptomicina, entre outros, retardam ou evitam o crescimento e a multiplicação bacteriana (OSORIO, 2006).

Os crioprotetores têm como função proteger as células e tecidos durante o congelamento e o descongelamento (ARRUDA, 2000; MELO, 2007), sendo importantes para evitar a formação de gelo intracelular (MEDEIROS, 2002). Um eficiente crioprotetor deve ter as seguintes características: baixo peso molecular, habilidade para atravessar as membranas das células vivas, capacidade de estabilização de membranas e sistemas enzimáticos; apropriado equilíbrio mineral e adequada combinação de nutrientes; sistema com capacidade de neutralizar catabólicos espermáticos; substâncias com capacidade protetora para as variações de temperatura (OSORIO, 2006; OLIVEIRA, 2007; CANISSO et al., 2008).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado no congelamento de sêmen de garanhões, uma vez que atua na proteção das estruturas celulares, tanto intra como extracelularmente; aumentando o número de canais de solvente que permanecem não congelados e diluindo as altas concentrações de sal (GRAHAM, 1996; ZIMMERMANN, 2007).

Altas concentrações de crioprotetores são deletérias aos espermatozóides devido a sua toxicidade e podem resultar na redução da fertilidade após a inseminação artificial. Embora a função destes agentes seja a de minimizar os efeitos negativos, há evidências que o glicerol é tóxico para o espermatozóide. Parte da toxicidade é devida à injúria bioquímica, resultado da adição direta do crioprotetor sobre componentes subcelulares, além de ocorrerem danos osmóticos (GILMORE et al., 1995; ARRUDA, 2000; BALL e VOSS, 2001; OSORIO, 2006; ZIMMERMANN, 2007).

Baseado nas metodologias de avaliação laboratorial e fertilidade a campo, a associação do glicerol com DMF mostrou ser uma alternativa para a criopreservação do espermatozóide eqüino (NEVES NETO et al., 2004).

A associação da DMF e glicerol, conforme a composição do meio diluidor MP50 proporcionou uma melhor proteção da célula espermática durante a

congelamento, pois além da obtenção de excelentes resultados laboratoriais pós-descongelamento manifestou índices de fertilidade superiores aos descritos na literatura (PAPA et al., 2002; PAPA et al., 2008). Este diluente combina os dois agentes citados sendo também enriquecidas com açúcares e substratos de cultivo celular como fontes de macromoléculas, além da presença de gema de ovo e leite desnatado, de modo que a associação destes componentes, da DMF e do glicerol são extremamente favoráveis a proteção do espermatozóide eqüino durante o processo de congelamento (PAPA et al., 2002; PAPA et al., 2008).

Crioprotetores utilizando apenas DMF apresentaram resultados superiores ao glicerol, para todos os parâmetros avaliados, independente das curvas de congelamento utilizadas (JULIANI et al., 2007; JULIANI et al., 2009). Sugere-se que de alguma forma a DMF protege a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides (JULIANI et al., 2007; JULIANI et al., 2009). Dimetil-formamida e metil formamida são crioprotetores que vem sendo utilizados com grande sucesso na congelamento de sêmen eqüino. No entanto, seu uso para congelamento de sêmen em ganhões com boa congelabilidade não proporcionou aumento da motilidade e sim resultados semelhantes ao glicerol (KEITH, 1998; MELO, 2007).

Snoeck et al. (2007), testaram cinco diluidores à base de lactose-EDTA-gema de ovo com diferentes concentrações de crioprotetores intracelulares, gema de ovo, açúcares e tampões. Os autores indicaram que o melhor diluidor foi o que possuiu uma alta concentração de açúcares, tampões e sais e 20% de gema de ovo para proteção da característica integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal.

A utilização do ácido hialurônico na crioproteção de espermatozoides eqüinos é limitado e, eventualmente, ganhão dependente. Seu uso em combinação com outros diluidores de congelamento poderia revelar-se útil em novos experimentos (BRUEMMER et al., 2009).

A adição do crioprotetor em diversas etapas do congelamento do sêmen associada a um resfriamento lento comprova ser o melhor tratamento para preservar a viabilidade espermática (MELLO et al., 2005). Entretanto, apesar dos efeitos benéficos do crioprotetor, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência após o congelamento e descongelamento (OLIVEIRA, 2007).

2.4.5 Envasamento

Muitas formas de envase de sêmen diluído já foram testadas. Atualmente os sistemas de envasamento mais comumente utilizados são as palhetas plásticas com capacidade de 0,25 mL e 0,5 mL com o objetivo de obter um congelamento mais uniforme das amostras (OSORIO, 2006). Segundo Papa et al. (2005), as palhetas de 0,25 mL apresentam desempenho superior comparada as palhetas de 0,50 mL e ao macrotubo. Estudos recentes constataram que a utilização de diferentes concentrações espermáticas em palhetas de 0,5 mL não influenciou os parâmetros espermáticos *in vitro* (BLANES et al., 2005). Segundo Nascimento et al. (2005 b) o melhor método de congelação, foi em concentração de 100×10^6 , seguido por 200×10^6 e após, 400×10^6 espermatozoides/mL, para todas as variáveis estudadas, tanto em palhetas de 0,50 quanto em 0,25 mL (NASCIMENTO et al., 2005 a; NASCIMENTO et al., 2005 b)

O aumento na concentração de espermatozoides a partir de 100 até 400×10^6 espermatozoides/mL resultou em uma diminuição das características seminais no pós-descongelamento nas palhetas de 0,25 mL e 0,50 mL, em ambas as palhetas resultaram em igualdade de características seminais, independentemente da concentração espermática de 100, 200, ou 400×10^6 espermatozoides/mL, não havendo assim a interação entre a concentração de espermatozoides e volume de palhetas para armazenamento. Além disso, a criopreservação de sêmen em baixa concentração aumentaria o número de palhetas por ejaculado (NASCIMENTO et al., 2008).

2.4.6 Congelamento

Até o momento diversos protocolos têm sido testados para o congelamento do sêmen eqüino, no entanto, ainda não se estabeleceu a curva ideal para o processo de congelamento. Outros fatores como a composição do meio extensor, adição e concentração do crioprotetor, taxas de resfriamento e qualidade do sêmen

dos ganhões também interferem no processo de congelamento. O sucesso no processo de congelamento se deve a uma boa interação entre os fatores citados (OSORIO, 2006; WAITE et al., 2008).

Estima-se que apenas 30-40% dos ganhões produzam sêmen de boa qualidade para o processo de congelação, sendo que a variação na congelabilidade espermática também ocorre entre as espécies (ALVARENGA et al., 2007; ZIMMERMANN, 2007).

Na maioria dos protocolos atualmente disponíveis para o congelamento é utilizada uma curva de congelamento rápida de $-60^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e esta é obtida pela exposição das palhetas horizontalmente, 3 cm acima do nitrogênio líquido (OSORIO, 2006).

Melo et al. (2007), não observaram diferença significativa dos parâmetros seminais na taxa de resfriamento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ou $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ por 24 horas antes do congelamento. O período de 20 minutos de estabilização em geladeira demonstrou-se favorável em relação ao tempo de 60 minutos quando da utilização do diluente Botu-Crio® nos parâmetros espermáticos (BLANES et al., 2005).

Uma taxa lenta de pré – congelamento (SLOW – taxa controlada por 80 minutos antes da criopreservação) obteve melhores resultados nos parâmetros seminais comparado a uma taxa rápida de pré – congelamento (FAST - imediatamente submetido à criopreservação) (SALAZAR et al., 2008).

2.4.7 Descongelamento

No descongelamento do sêmen as células são expostas a uma rehidratação celular, pela entrada de água na célula através da membrana plasmática balanceando sua osmolaridade. Os lipídios e proteínas da membrana plasmática são reorganizados provocando a saída do crioprotetor para fora das células. Devido a este processo, ocorre uma grande perda na viabilidade das células espermáticas (WATSON, 2000).

Dell'acqua Jr. e Papa (2001) sugerem três temperaturas de descongelamento para as mini-palhetas 0,25 mL, 38°C por 30 segundos, 46°C por 20 segundos e 65°C por 7 segundos. A temperatura que proporcionou melhores parâmetros

espermáticos como motilidade progressiva, em análises computadorizadas foi 65°C por 7 segundos.

Porém Fürst et al. (2005) afirmam em seus estudos que o descongelamento do sêmen a 75°C por sete segundos bem como o de 37°C por 30 segundos não demonstrou diferença na taxa de motilidade pós-descongelamento. Entretanto o sêmen descongelado a 75°C apresentou melhor vigor que o descongelado a 37°C.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados cinco garanhões da raça Pantaneira, com idade variando entre 36 a 96 meses de idade, com número de registro RG 644 (P1); RG 649 (P2); RG 615 (P3); RG 583 (P4) e RG 850 (P5)(Figura 01), oriundos do município de Poconé – MT. Todos os garanhões foram mantidos estabulados em iguais condições de criação durante o período experimental. Os animais foram alimentados com ração comercial, forrageira e sal mineral para eqüinos. Água foi oferecida *ad libitum*.

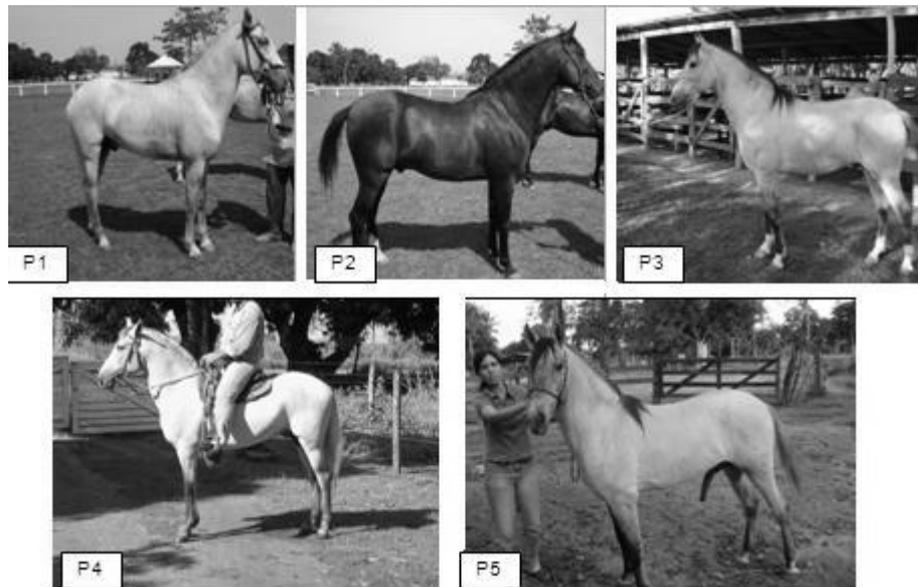


Figura 01 - Garanhões da raça Pantaneira utilizados no experimento.

Todos os animais utilizados eram de fertilidade comprovada, e foram selecionados de acordo com exames clínicos e andrológicos, segundo as normas do Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (MANUAL..., 1998).

3.2 Coleta do Sêmen

Um total de quatro ejaculados foi coletado de cada garanhão em dias alternados. Para a coleta do sêmen foi utilizado o método da vagina artificial de fundo fechado (modelo Hannover) e um manequim (Figura 02).

Os garanhões foram treinados a saltar inicialmente em égua em estro e posteriormente no manequim (Figura 03). Nos animais que não aceitaram o manequim foi utilizada uma égua em estro induzido (Figura 04).

A indução do estro na égua foi realizada da seguinte forma: três dias antes das coletas foi aplicado 5 mL de Cipionato de Estradiol (E.C.P.® 2mg/mL / Pfizer®) por via intra muscular, sendo que durante o período de coletas a égua recebia 3 mL do Cipionato de Estradiol por via intra muscular uma vez ao dia.



Figura 02 – Garanhão saltando no manequim.



Figura 03 – Treinamento do garanhão para coleta em manequim: Monta em égua em estro (a); Reconhecimento do manequim com urina de égua em estro pelo reflexo de Fleming (b); Garanhão saltando no manequim (c); Coleta de sêmen com vagina artificial (d).

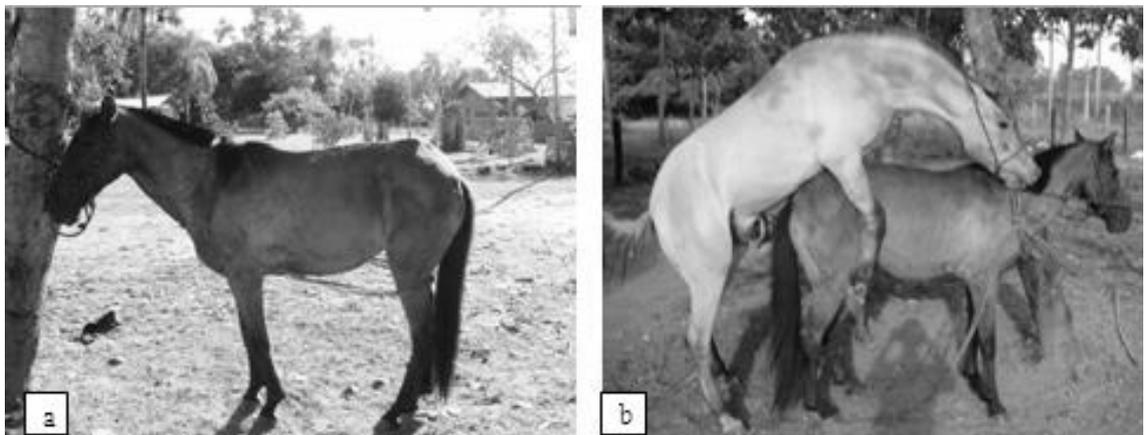


Figura 04 – Égua contida em estro induzido (a); Coleta de sêmen em égua em estro induzido (b).

3.3 Avaliação do Sêmen

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi filtrado e a porção livre de gel foi avaliada quanto ao volume, motilidade, vigor e concentração.

A motilidade e o vigor foram observados em microscópio ótico, em aumento 40x utilizando uma gota de sêmen sobre uma lamina coberta por lamínula, pré-aquecida a 37°C. A motilidade foi expressa em porcentagem conforme a proporção de espermatozóides móveis por campo e o vigor foi avaliado de acordo com a velocidade que o espermatozóide atravessava o campo de visão. O mesmo foi classificado de zero a cinco, onde zero é ausência de movimento progressivo com deslocamento de cauda lateral fraco e inexpressivo e cinco resulta em movimento vigoroso e veloz dos espermatozóides (MANUAL..., 1998).

Uma alíquota do sêmen foi diluída em solução de formol-salino na proporção 1:100 para contagem de espermatozóides em câmara de Neubauer. Essa mesma alíquota diluída foi utilizada posteriormente para a avaliação da morfologia espermáticas pela contagem de 200 células em câmara úmida, utilizando microscópio de contraste de fase em aumento de 1000x .

A avaliação das características morfológicas dos espermatozóides foi realizada de acordo com a classificação de Blom a determinação de defeitos maiores e defeitos menores (BLOM, 1972).

Para avaliação de integridade de acrossoma, foi utilizada a coloração de Pope et al (1999), na qual se acrescenta 3 µl de sêmen e 3 µl de corante Pope sobre uma lamina fazendo-se o esfregaço (Figura 05). Para a leitura foram contadas 200 células em microscópio óptico binocular em aumento de 1000x.

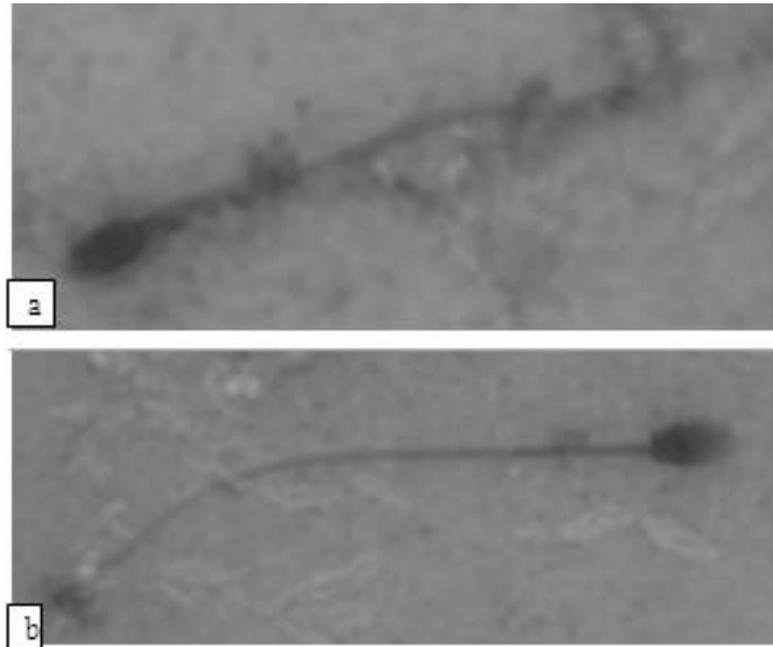


Figura 05 - Espermatozóide com acrossoma íntegro (a).
Espermatozóide com acrossoma lesado (b).

3.4 Congelamento do Sêmen

O sêmen foi fracionado em seis alíquotas de 1 mL e diluído na proporção de 1:1 nos seguintes extensores comerciais: T1= Botu sêmen®; T2= Equimix®; T3= Max sêmen®; T4= Max sêmen plus®; T5= FR1® e T6= FR4® (Figura 06).

Após a diluição o sêmen foi centrifugado a 1500 g por 10 minutos (Figura 07). O sobrenadante foi recuperado e avaliado quanto à motilidade e vigor. Ao pellet foi adicionado 1 mL do diluidor Botu-crio® em todos os tratamentos .



Fonte: Nutricell

Fonte: E.H.G.



Fonte: E.H.G.



Fonte: Nutricell

Figura 06 – Extensores comerciais 1 = Botu sêmen®; 2 = Equimix®; 3 = Max sêmen®; 4 = Max sêmen plus®; 5 = FR1® e 6= FR4®. O BC = Botu-crio®



Figura 07 – Centrifuga e tubos identificados conforme tratamento.

Após a adição do diluidor o sêmen foi envasado em quatro palhetas de 0,25ml na concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL por palheta.

As palhetas foram envasadas por aspiração, identificadas conforme o tratamento (Figura 08), lacradas com álcool polivinílico e resfriadas a 5°C por 20 minutos. Após este período as palhetas foram transferidas para um suporte em uma caixa de isopor contendo nitrogênio líquido a uma distância de 4 cm acima do nível de nitrogênio, onde permaneceram por 20 minutos, sendo então mergulhadas em nitrogênio líquido e transferidas para um botijão criogênico (PAPA et al., 2002).



Figura 08– Palhetas identificadas conforme o animal, data e tratamento.

3.5 Descongelamento do Sêmen

As amostras foram descongeladas a temperatura de 46°C por 20 segundos (DELL'AQUA et al, 2001) em banho-maria, sendo o sêmen armazenado em microtubos, previamente aquecido a 37 °C em placa aquecedora (Figura 09 e 10).



Figura 09 – Banho – maria (FANEM® - Model 1100)



Figura 10 – Placa aquecedora (Master Digital AS 300)

A motilidade e o vigor espermáticos foram avaliados por microscopia óptica imediatamente após o descongelamento como descrito anteriormente.

Para avaliação da integridade do acrossoma foi utilizada a coloração Pope pela contagem de 200 células.

Uma alíquota do sêmen foi diluída em formol salino na proporção 1:1 para avaliação das anormalidades espermáticas, pela contagem de 200 células em câmara úmida (Figura 11).



Figura 11 - Alíquota do sêmen diluída em formol salino conforme tratamento.

3.6 Análise Estatística

Os resultados de motilidade, vigor, espermatozoides morfologicamente deformados e defeitos de acrossoma foram submetidos à análise de variância inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 4 repetições, com aplicação do teste de Tukey para comparação de médias. Os testes estatísticos foram usados para comparação sêmen a fresco, após a centrifugação e após o descongelamento utilizando o programa estatístico SAEG (UFV,1993).

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DO SÊMEN A FRESCO COLHIDO COM VAGINA ARTIFICIAL

Na tabela 2 estão apresentados os resultados das características seminais dos animais experimentais. Nas tabelas 3 e 4 estão apresentados os dados referentes às morfologia espermáticas do sêmen a fresco.

Tabela 2 - Média e desvio padrão do volume total, motilidade, vigor, concentração, morfologia espermáticas e integridade de acrossoma de sêmen a fresco de Cavalos Pantaneiros, Poconé, Mato Grosso, 2009.

Garanhão	Volume (mL)	Motilidade (%)	Vigor (1-5)	Concentração ($\times 10^6$ /mL)	Morfologia (%)	Acrossoma (%)
P1 (n=4)	72,50 \pm 39,61	76,25 \pm 11,39	3,5 \pm 0,5	421,87 \pm 204,10	9,91 \pm 1,72	98,37 \pm 0,82
P2 (n=4)	47,50 \pm 12,50	68,75 \pm 2,16	4 \pm 0	243,75 \pm 121,06	19,03 \pm 3,96	95,50 \pm 0,97
P3 (n=4)	41,75 \pm 13,72	95,00 \pm 0	4 \pm 0	1247,5 \pm 333,49	13,75 \pm 5,46	95,87 \pm 1,08
P4 (n=4)	24,25 \pm 11,32	82,50 \pm 10,31	4 \pm 0	107,87 \pm 200,08	9,81 \pm 3,94	98,12 \pm 0,89
P5 (n=4)	21,00 \pm 5,09	75,00 \pm 12,75	3,5 \pm 0,5	300,0 \pm 213,54	11,20 \pm 4,21	98,12 \pm 0,54
Total (n=20)	41,40 \pm 20,70	79,50 \pm 9,95	3,8 \pm 0,27	464,19 \pm 452,18	12,74 \pm 3,86	97,19 \pm 1,39

Tabela 3 – Média e desvio padrão dos defeitos maiores encontradas no sêmen a fresco de Cavalos Pantaneiros, Poconé, Mato Grosso, 2009.

Garanhões	Cabeça Dupla (%)	Cabeça Isolada (%)	Cabeça Piriforme (%)	Acrossoma (%)	Gota Proximal (%)	Cauda fortemente enrolada (%)
P1 (n=4)	0,12±0,24	0,6±0,46	0,36±0,24	0,12±0,24	0,24±0,28	0,59±0,89
P2 (n=4)	0,12±0,25	2,29±2,23	0,73±0,48	0,35±0,24	0,78±0,84	2,57±1,03
P3 (n=4)	0±0	0,98±0,64	0,1±0,21	0,12±0,24	0,24±0,47	1,06±0,26
P4 (n=4)	0,12±0,24	2,94±0,37	0,37±0,25	0,24±0,48	0,48±0,97	1,71±1
P5 (n=4)	0,35±0,23	1,45±1,78	0,59±0,44	0±0	0,8±0,79	0,57±0,21
Total (n=20)	0,14±0,13	1,65±0,96	0,8±0,24	0,17±0,13	0,51±0,27	1,3±0,85

Tabela 4 – Média e desvio padrão dos defeitos menores encontradas no sêmen a fresco de Cavalos Pantaneiros, Poconé, Mato Grosso, 2009.

Garanhões	Cabeça Grande (%)	Cabeça Pequena (%)	Cabeça Lanciforme (%)	Gota Distal (%)	Cauda enrolada (%)	Cauda dobrada (%)
P1 (n=4)	0±0	1,21±0,62	0,73±0,17	0,17±0,29	0,36±0,24	3,87±1,31
P2 (n=4)	0,5±1	0,12±0,23	1,22±1,04	0±0	0,77±0,44	5,49±4,81
P3 (n=4)	0±0	1,34±1,38	0,84±0,5	0,36±0,46	0±0	8,34±7,34
P4 (n=4)	0±0	0,9±0,42	0,12±0,24	0,24±0,48	0±0	2,07±2,03
P5 (n=4)	0,25±0,5	2,48±0,81	0,11±0,22	0,12±0,25	0,74±0,29	1,45±0,82
Total (n=20)	0,15±0,22	1,21±0,85	0,6±0,48	0,18±0,13	0,37±0,38	4,24±2,78

4.2.AVALIAÇÃO DE MOTILIDADE E VIGOR ESPERMÁTICOS APÓS DILUIÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO NOS DIFERENTES TRATAMENTOS

Os dados referentes aos tratamentos para cada animal após a diluição e centrifugação estão nas figuras 12 e 13.

Figura 12 – Média da motilidade espermática de sêmen de Cavalos Pantaneiros em cada tratamento após diluição e centrifugação, Poconé, Mato Grosso, 2009.

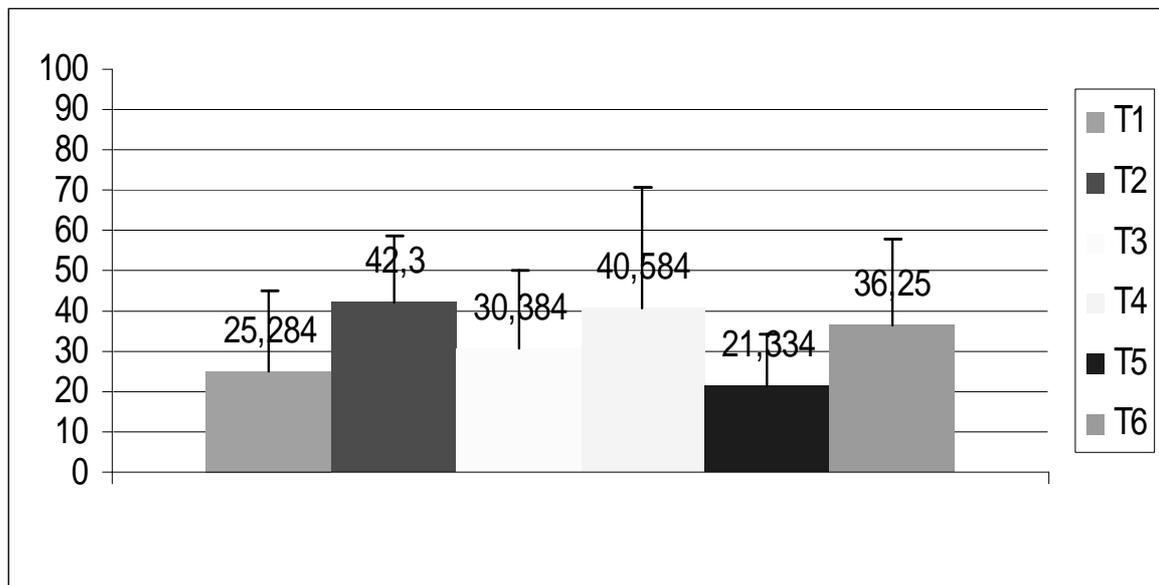
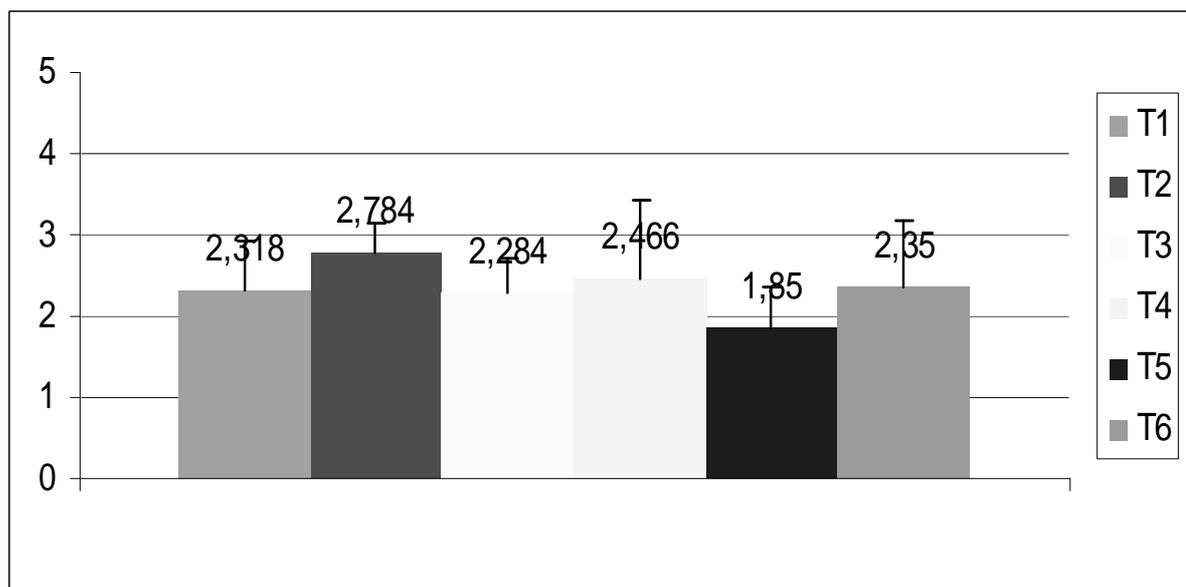


Figura 13 - Média do vigor espermático de sêmen de Cavalos Pantaneiros em cada tratamento após diluição e centrifugação, Poconé, Mato Grosso, 2009.



4.3 AVALIAÇÃO MORFOFISIOLÓGICA DO SÊMEN APÓS DESCONGELAMENTO

Dados referentes aos tratamentos para cada animal após o descongelamento estão na figura 14. A figura 15 encontra-se os dados referentes à avaliação do sêmen antes e após congelamento com o diluidor Botu-crio®. Na tabela 8 e 9 são apresentados os dados referentes às morfologia espermáticas encontradas após o descongelamento do sêmen.

Figura 14 - Média da motilidade, vigor, morfologia espermática e integridade de acrossoma de sêmen de Cavalos Pantaneiros em cada tratamento após o descongelamento, Poconé, Mato Grosso, 2009.

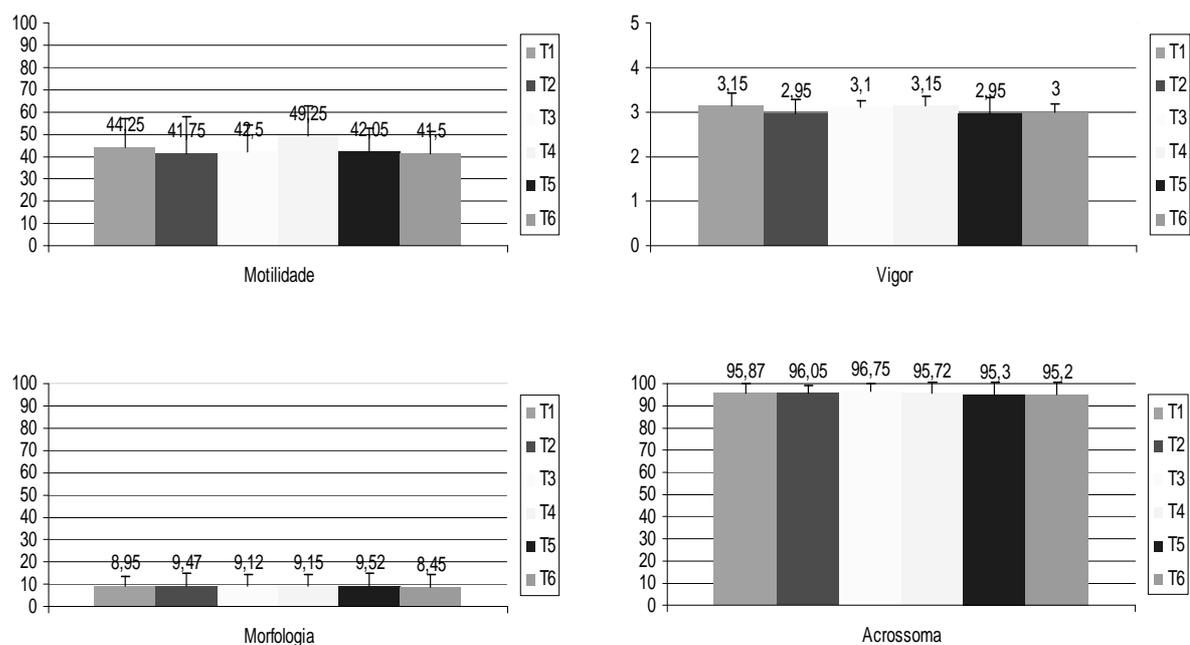


Figura 15 - Media da motilidade, vigor, morfologia espermáticas e porcentagem de acrossomas íntegros de sêmen de cavalos pantaneiros pré e pós congelamento. Poconé, Mato Grosso, 2009.

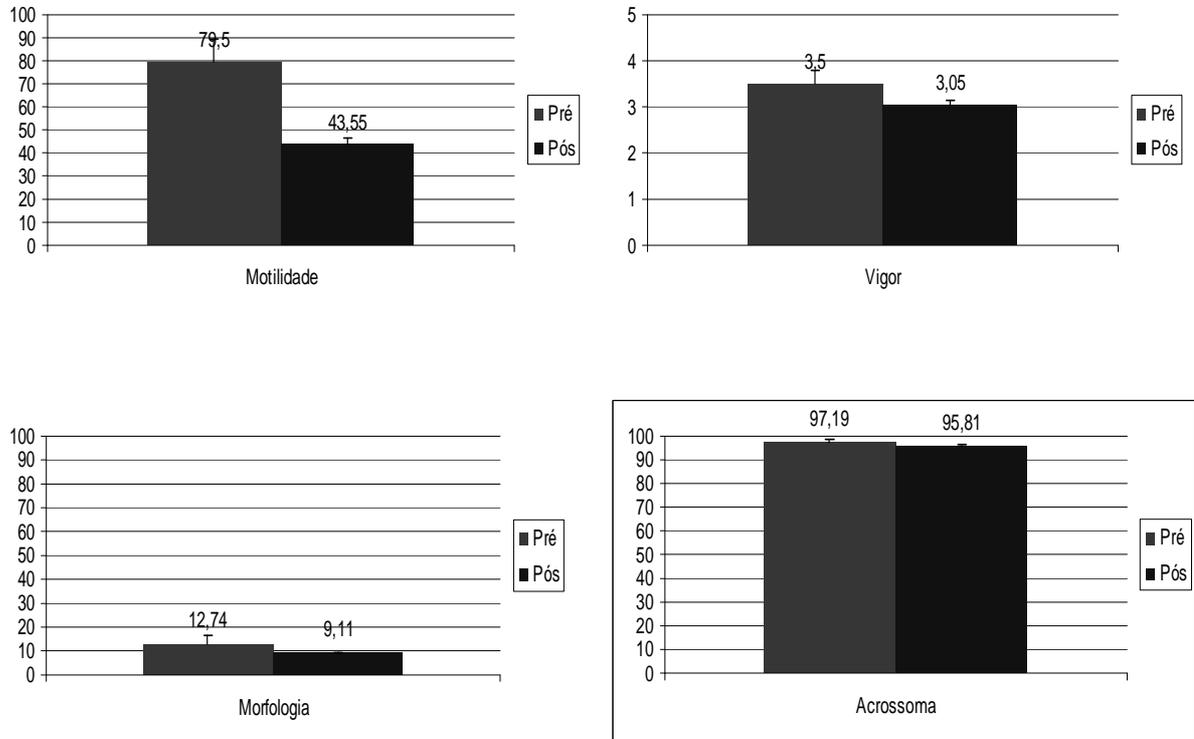


Tabela 5 – Média e desvio padrão dos defeitos maiores encontradas no sêmen após descongelamento de Cavalos Pantaneiros, Poconé, Mato Grosso, 2009.

Garanhões	Cabeça Dupla (%)	Cabeça Isolada (%)	Cabeça Piriforme (%)	Acrossoma (%)	Gota Proximal (%)	Cauda fortemente enrolada (%)
P1 (n=24)	0,17±0,41	1±0,31	0,29±0,33	0,33±0,26	0,25±0,27	0,75±0,39
P2 (n=24)	0,46±0,24	1,54±0,63	0,60±0,15	0,65±0,33	0,74±0,43	0,08±0,47
P3 (n=24)	0,33±0,41	0,92±0,09	0,37±0,44	0,42±0,2	0,37±0,31	0,93±0,46
P4 (n=24)	0,33±0,41	0,88±0,37	0,69±0,4	0,83±0,2	0,83±0,37	0,33±0,33
P5 (n=24)	0,58±0,20	1,24±0,41	0,5±0,32	0,58±0,38	0,75±0,47	0,71±0,29
Total (n=120)	0,37±0,15	1,12±0,27	0,49±0,16	0,56±0,2	0,59±0,26	0,56±0,34

Tabela 6 – Média e desvio padrão dos defeitos menores encontradas no sêmen após descongelamento de Cavalos Pantaneiros, Poconé, Mato Grosso, 2009.

Garanhões	Cabeça Grande (%)	Cabeça Pequena (%)	Cabeça Lanciforme (%)	Gota Distal (%)	Cauda enrolada (%)	Cauda dobrada (%)
P1 (n=24)	0,08±0,2	0,89±0,37	0,64±0,22	0±0	0,37±0,31	3,44±0,57
P2 (n=24)	0,08±0,2	0,71±0,17	0,92±1,77	0,71±0,2	0,97±0,60	0,69±0,68
P3 (n=24)	0,05±0,12	0,54±0,29	0,83±0,2	0±0	0,42±0,2	3,12±0,74
P4 (n=24)	0±0	0,57±0,33	2,05±1,21	0,61±0,41	0,88±0,40	0,08±0,2
P5 (n=24)	0±0	0,75±0,22	0,68±0,44	0±0	0,17±0,26	3,51±0,76
Total (n=120)	0,04±0,04	0,69±0,14	1,02±0,58	0,26±0,36	0,56±0,34	2,17±1,65

Diante dos resultados estatísticos apresentados observamos que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os extensores testados, antes e após o congelamento do sêmen de cavalos da raça Pantaneira.

5. DISCUSSÃO

Ribas (2007) afirma que o cavalo Pantaneiro é uma raça diferenciada, pois não sofre ação da sazonalidade como ocorre em outras raças. No entanto, optamos por fazer as coletas no mês de setembro, período de início das chuvas no Pantanal e época propícia para o nascimento dos potros, aproveitando o esgotamento das reservas extragonadais como sugerido por Osório (2006).

Segundo Silva Filho et al. (1999) um manequim artificial pode ser utilizado na coleta do sêmen eqüino, necessitando apenas de treinamento prévio do garanhão. No entanto, alguns dos animais experimentais não aceitaram o manequim artificial. Diante da dificuldade para obtenção de novos animais utilizamos uma égua em estro induzido naqueles que refugaram o manequim.

A fração rica em espermatozóides deve ser avaliada imediatamente após a coleta quanto às suas características: volume, motilidade, vigor, morfologia espermática e concentração (MANUAL..., 1998; SILVA, 2000; OSORIO, 2006; ARRUDA et al., 2007; ZIMMERMANN, 2007; VARNER, 2008).

Após a coleta é importante que se realize a separação do gel do ejaculado através da filtração (CANISSO et al., 2008). Notou-se que apenas um animal (P1) ejaculava grandes volumes de gel em comparação aos outros animais o que explicaria o seu maior volume ($72,50 \pm 39,61$ mL) em comparação aos demais garanhões mesmo após a filtragem (P2= $47,50 \pm 12,50$ mL; P3= $41,75 \pm 13,72$ mL; P4= $24,25 \pm 11,32$ mL e P5= $21,00 \pm 5,09$ mL).

As primeiras análises realizadas após a coleta do sêmen devem ser relacionadas a motilidade e o vigor. A média das características seminais descritas para motilidade ($79,5 \pm 9,95\%$) e vigor ($3,8 \pm 0,27$) dos garanhões utilizados neste experimento, colhidos com vagina artificial, estão condizentes com os parâmetros considerados normais para a espécie eqüina (motilidade $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3) (MANUAL...,1998).

Quanto ao percentual de alterações morfológicas dos espermatozóides, houve uma variação de $9,81 \pm 3,94$ a $19,03 \pm 3,96\%$ entre os garanhões. Observamos que a morfologia espermática de maior ocorrência foi cauda dobrada ($2,17 \pm 1,65\%$) em comparação ao total de defeitos encontrados ($12,74 \pm 3,86\%$), no entanto, os resultados encontrados estão dentro dos parâmetros normais (30%), sugeridos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução (1998).

Vidament et al. (1997) afirmam que a concentração espermática pode apresentar variação entre raças entre animais da mesma raça ou mesmo individuais. Esta afirmação pode ser observada neste experimento, onde encontramos uma variação de concentração individual e entre animais conforme mostrado na Tabela 2 (médias variando entre $243,75 \times 10^6$ /mL a $1247,5 \times 10^6$ /mL).

Quanto às alterações de acrossoma, podemos observar que os ganhões apresentaram integridade entre 95% a 98%, sendo que o corante Pope, formulado inicialmente para sêmen de felinos, mostrou-se eficiente para avaliação da integridade de acrossoma em espermatozóide de eqüinos.

De acordo com os resultados apresentados o sêmen de todos os animais experimentais estava apto ao congelamento, podendo dessa maneira, ser utilizado na avaliação da influencia de diferentes extensores comerciais no processo de congelamento e descongelamento.

A remoção do plasma seminal se faz necessária para a sobrevivência dos espermatozóides no processo de congelamento (BRISCO et al., 2000; MOORE et al., 2002; MIRO et al., 2009; LEN et al., 2010). No entanto, a centrifugação após adição de extensores, utilizada para retirada do plasma seminal antes do processo de congelamento, pode causar danos aos espermatozóides. Para minimizar seus efeitos deletérios são utilizados extensores específicos (WAITE et al., 2008).

Os extensores seminais são meios enriquecidos com diferentes substâncias as quais oferecem um ambiente adequado aos espermatozóides para sua sobrevivência (OSORIO, 2006). Os extensores comerciais utilizados neste experimento têm na sua composição açúcares, leite, gema de ovo e antibióticos. Estas substâncias oferecem um ambiente adequado aos espermatozóides para sua sobrevivência após a centrifugação e também durante o processo de congelamento (MASUDA et al., 2004; OSORIO, 2006; ZIMMERMANN, 2007; MIRO et al., 2009).

Para verificação da ação imediata da diluição e centrifugação do sêmen nos diferentes extensores comerciais utilizados antes do congelamento, o sêmen foi avaliado quando a motilidade e vigor imediatamente após a centrifugação.

Nos resultados obtidos na análise da motilidade e vigor, após diluição e centrifugação do sêmen nos diferentes extensores comerciais, observamos que cada animal apresentou uma tendência de acordo com cada extensor utilizado, conforme demonstrado nas figuras 12 e 13. Apesar de haver diferença visível entre os tratamentos (T4=motilidade $49,25 \pm 13,77\%$ e vigor $3,15 \pm 0,22$ e T6=motilidade

41,50 ± 9, 66% e vigor 3 ± 0,18), após análise estatística observamos que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p \geq 0,05$). Provavelmente esta igualdade entre os tratamentos se deve ao fato de ter ocorrido uma tendência de cada garanhão por um extensor, como citado por Zuccari et al. (2004), que afirmam existir uma variabilidade na sensibilidade espermática entre garanhões e/ou entre ejaculados de um mesmo garanhão.

A tecnologia para armazenar o sêmen congelado tem sido de grande importância em programas de melhoramento animal por viabilizar a preservação de material genético de animais em extinção, além de auxiliar a transpor barreiras da infertilidade masculina (WATSON, 2000). A utilização da criopreservação do sêmen para raça Pantaneira surge como uma importante ferramenta para sua preservação, pois a raça está próxima do estado vulnerável de extinção.

A escolha do diluidor Botu-Crio® se deve a diversos estudos realizados comprovando a sua eficiência perante os demais crioprotetores mais utilizados e suas variações (MELO et al., 2007; ZIMMERMANN, 2007; PAPA et al., 2008).

Até o momento não existe um protocolo de congelamento que determine a recuperação de 100% de espermatozoides viáveis, sendo as perdas consideradas normais durante o processo. Inúmeros são os fatores que podem interferir na fertilidade do sêmen congelado, tais como, volume e concentração das palhetas, curva de resfriamento/congelamento e temperatura e tempo de descongelamento das palhetas, além dos extensores e diluidores.

Segundo Nascimento et al. (2008) a utilização de palhetas de 0,25 mL na concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL indicaram um melhor resultado na característica seminal após descongelamento. Neste experimento optamos pelo uso das palhetas de 0,25 mL na concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL, por nos proporcionar um número maior de palhetas por ejaculado.

Para o descongelamento das palhetas inicialmente utilizamos o protocolo de Dell'acqua Jr. e Papa (2001), o qual utiliza imersão das palhetas em banho-maria a 65°C por 7 segundos. Entretanto, utilizando-se este protocolo apenas um animal (P2) apresentou resultados satisfatórios, nos demais animais houve grande percentual de mortalidade dos espermatozoides após descongelamento. Devido a este fato, optamos por utilizar o protocolo sugerido por Dell'acqua Jr et al. (2001) o

qual utiliza imersão das palhetas congeladas em banho-maria a 46°C por 20 segundos.

Fürst et al. (2005) utilizando garanhões da raça Mangalarga Machador, comprovaram em seus estudos que o descongelamento a 75°C por 7 segundos demonstrou uma taxa de motilidade após descongelamento superior ao sêmen descongelado a 37°C por 30 segundos. O uso de uma raça nacional questionou a particularidade da raça Pantaneira, porém como houve um animal (P2) que não demonstrou diferença relacionada à temperatura de descongelamento, mais estudos devem ser efetuados para comprovar esta particularidade da raça.

A avaliação das características espermáticas após o descongelamento apresentou bons resultados, comprovando a qualidade do Botu-crio® pela adequada proteção que proporcionou ao sêmen da raça.

Podemos observar que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre os 6 tratamentos em qualquer um dos parâmetros estudados. Observa-se também que os 6 extensores utilizados determinaram bons resultados sobre o congelamento de sêmen de cavalos Pantaneiros.

Na figura 14 observa-se a porcentagem da motilidade dos animais/tratamento, a qual se apresentou superior a 40%, sendo 10% a mais que o exigido pelo Colégio Brasileiro de Reprodução (1998). Na mesma figura podemos observar que o vigor após o descongelamento manteve o padrão sugerido pelo CBRA (3,0) nos tratamentos T1 ($3,15 \pm 0,28$), T3 ($3,1 \pm 0,14$), T4 ($3,15 \pm 0,22$), e T6 ($3,0 \pm 0,18$), apenas os tratamentos T2 ($2,95 \pm 0,32$) e T5 ($2,95 \pm 0,37$) não atingiram os padrões, porém apresentaram-se apenas 0,05 abaixo do exigido.

Observamos na figura 15 a baixa porcentagem de morfologia espermática encontradas no sêmen descongelado (<10%). Da mesma maneira, podemos observar a baixa porcentagem de lesão de acrossoma (<5%). Com estes resultados podemos afirmar que os extensores e o diluidor utilizados proporcionaram adequada proteção ao sêmen durante o processo de congelamento e descongelamento do mesmo.

Em estudo realizado por Osório (2006) a criopreservação de sêmen na espécie eqüina indicou não haver diferença significativa entre o vigor espermático pré e após descongelamento. Resultado semelhante foi encontrado neste experimento, onde foram observados valores de 3,80 no sêmen *in natura* e 3,05 após descongelamento (Figura 15).

Na figura 15 observamos as diferenças entre o sêmen a fresco e o descongelado. Podemos observar que houve queda da motilidade (de $79,5 \pm 9,94\%$ para $43,55 \pm 3,11\%$), o qual já era esperado devido ao choque térmico que os espermatozóides sofrem no processo de criopreservação (OLIVEIRA, 2002; OSORIO, 2006). No entanto, houve diminuição na porcentagem de morfologia espermática (de $12,74 \pm 3,86\%$ para $9,11 \pm 0,24\%$) e na porcentagem de acrossomas íntegros (de $97,19 \pm 1,39\%$ para $95,81 \pm 0,53\%$). Apesar da diminuição na porcentagem de anormalidades espermáticas, podemos observar que a patologia com maior ocorrência foi a de cauda dobrada ($4,54 \pm 3,36\%$) a mesma observada no sêmen a fresco.

Diante do fato dos extensores necessitarem de refrigeração (FR1®), congelamento (FR4®) ou poderem ser mantidos a temperatura ambiente (Botu sêmen®; Equimix®; Max sêmen®; Max sêmen plus®) e considerando as dificuldades encontradas pelos produtores na região do Pantanal Matogrossense, estes resultados apresentam um leque de opções que pode favorecer a utilização do congelamento de sêmen em reprodutores da região. Da mesma maneira, com estes resultados o produtor poderá escolher o melhor produto visando maior produção e menor custo.

6. CONCLUSÃO

A adição de diferentes extensores comerciais em sêmen de cavalos da raça Pantaneira, não obteve diferença estatística significativa na centrifugação e após o descongelamento.

Diante dos resultados encontrados concluímos que para a raça Pantaneira todos os extensores comerciais testados neste estudo mostraram-se satisfatórios e podem ser utilizados para o congelamento de sêmen nesta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKÇAY, E. The Effects of Seminal Plasma, Skim Milk, and Tyrodes Solutions on Survival of Stallion Sperm Stored at 4 °C. *Turk. Journal Veterinary Animal Science*, v.5, n32, p.379-384, 2008.

ALDERSON, G. L. H. A system to maximize the maintenance of genetic variability in small population. In: ALDERSON, L.; BODÓ, I. Genetic conservation of domestic livestock. Wallingford: **C.A.B International**, v.2, p.18-29, 1992.

ALMEIDA, J. L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen eqüino**, 2006. Tese – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

ALVARENGA, M. A.; do CARMO, M. T.: Biotecnologia em reprodução eqüina: o que há de novo para o veterinário de campo?. **Revista Brasileira de Medicina Eqüina**, v. 2, n. 14, p.26-30, 2007.

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

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 eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.8-16, jan./mar. 2007.

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL,C.F.; PERES, K.R.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S.M.M.K.; BIANCONI, L.L. Effects of addition of seminal plasma on lifespan of frozen–thawed equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Resumo, p. 6-7, 2008.

BALL, B.A., VO, A.: Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069, 2001.

BLANES, M.S.; PAPA, F.O.; DORES, C.B.; MELO, C.M.; CROCCI, A.J. Influência do número de espermatozóides e tempo de estabilização na congelação de sêmen eqüino utilizando-se diluente botu-crio® **Acta Scientiae Veterinariae** , n. 33, suplemento 1, p.303, 2005.

BLOM E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. In: Atti del VII SIMPOSIO INT DI ZOOTECHNIA MILAN, 7., 1972, Milan. **Proccedings**, p.125-139, 1972.

BRINSKO SP, CROCKETT EC, SQUIRES EL. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, n.54, p. 129–136, 2000.

BRUEMMER, J.E.; WILSON, C.H.; COUTINO DA SILVA, M.; SQUIRES, E.L. Effects of Hyaluronan Supplementation on Cryopreserved Equine Spermatozoa Hyaluronan and Cryopreserved Equine Spermatozoa **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n.4, p.223-227, 2009.

CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; SILVA, E. C.; CARVALHO, G.R., GUIMARÃES, J. D.; LIMA, A.L. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM EQUINOS: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Revista Acadêmica de Ciência Agrária e Ambiental**, v. 6, n. 3, p. 389-398, 2008.

CORRÊA FILHO, E.A. O cavalo Pantaneiro. **Revista Medicina Veterinária**, n.8, p. 395 – 412, 1973.

DELL'AQUA Jr., J. A. **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado eqüino**. 2000. 81p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

DELL'AQUA Jr., J. A.; PAPA, F. O.; ZAHN, F.S. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v.67, p. 344–346, 2001.

DOMINGUES, O. Contribuição ao estudo do cavalo Pantaneiro. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura**, p.19, 1957.

E.H.G Agrofarma, Comercio de Medicamentos Veterinários e Correlatos. Disponível em: <<http://www.ehgagrofarma.com.br/listagem.asp?g=3&busca=&itens=9&d=79&s=126>>. Acesso em 27 abr. 2009.

F.A.O. Food and agriculture organization of the united nations World watch list for domestic animal diversity,v.744, p. 2000, 2000.

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

FAYRER-HOSKEN, R.; ABREU-BARBOSA, C.; HEUSNER, G.; JONES, L. Cryopreservation of Stallion Spermatozoa with INRA96 and Glycerol. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, p. 672-676, 2008.

FÜRST, R.; CARVALHO, G.R. ; FÜRST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M.; MAFILL, V. Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5, p.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. **Biological Reproduction**, v. 53, 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. **Avaliação comparativa do sêmen eqüino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia**, 2006. Tese Universidade do Paraná, Curitiba.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in Farm Animals**. Ed. 7, p. 212, 2000

JULIANI, G.; OSORIO, J. P.; LAGARES, M.A. ; ALVES, B.R.C.; HENRY, M. **Efeito da adição fracionada da dimetil formamida na criopreservação da célula espermática equine**. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. *Anais ...* Belo Horizonte, MG: CBRA, 2007. P. 167.

JULIANI, G.; OSORIO, J.P.; HENRY, M. **Efeito de diferentes crioprotetores e curvas de congelamento sobre os espermatozoides eqüinos criopreservados. Resumos apresentados pelos autores durante a Sessão de Posters do XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, de 3 a 5 de junho de 2009.P. 204.**

JOBIM, M.I.M. ; BUSTAMANTE FILHO, I.C.; DUTRA FILHO, C.S.; PEDERZOLLI, C.D.; SGARAVATTI, A.M.; GREGORY, J.W.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. **Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen eqüino**. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. *Anais ...* Belo Horizonte, MG: CBRA, 2007. P. 162.

LEÃO, K.M.; PUOLI FILHO, J.N.P.; ALVARENGA, M.A **Avaliação de diferentes técnicas de inseminação artificial em éguas utilizando um baixo número de espermatozoides . Acta Scientiae Veterinariae**, n.32, p. 173, 2004.

LEN, J.A. ; JENKINS, J.A. ; EILTS, B.E.; PACCAMONTI, D.L.; LYLE, S.K. ; HOSGOOD, G. Immediate and delayed (after cooling) effects of centrifugation on equine sperm. **Theriogenology** , n.73, p. 225–231, 2010.

Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **Colégio Brasileiro de Reprodução**. ed.2, p.25-28, 1998.

MASUDA , H.; NANASAKI, S; CHIBA, Y. A new extender for preservation of equine spermatozoa at 5 ° C. **Journal equine science**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2004.

MEDEIROS, A.S.L.; GOMES, G.M.; CARMO, M.T.C.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v.58, p.273-276, 2002.

MELLO, F.G.; SILVA, A.; GOMES, M. G. T.; OSORIO, J. P.; HENRY, M. R. J. M. Efeitos da adição fracionada da dimetil-formamida ao meio diluidor e duas curvas de resfriamento na preservação da viabilidade de espermatozóide eqüinos congelados. In: Congr. Bras. de Reprod. Animal. **Anais...**, v.16, p.268, Goiânia, GO, 2005. (Resumos

MELO, C.M.; ZAHN, F.S.; MARTIN, I; TRINQUE, C.L.A.; ALBERTI, K.; ORLANDI, C.; SIQUEIRA-FILHO, E.R; DELL'AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Fertilidade de sêmen congelado equino após 24h de refrigeração. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.33, Suplemento 1, p.300, 2005.

MELO, C.M.; ZAHN, F.S.; MARTIN, I; ORLANDI, C, DELL'AQUA JR., 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**, v.27, n.4, p.171-175, 2007.

MELO, C.M.; VILLAVERDE, A.I.S.B; FELICIO, G.B; WECHSLER, F.S; PAPA, F.O. Comparação de dois diluentes na refrigeração de sêmen eqüino durante 24h antes da congelarão. **Veterinária e Zootecnia**. v. 15, n. 12, p. 325-331, 2008.

METCALF, E.S. The efficient use of equine cryopreserved sêmen. **Theriogenology**, n.68, p.423–428, 2007.

MISERANI, M. G.; MCMANUS, C.; SANTOS, S. A.; SILVA, J. A.; MARIANTE, A. S.; ABREU, U. G. P. Avaliação dos Fatores que Influem nas Medidas Lineares do Cavallo Pantaneiro. **Revista Brasileira de Zootecnia**., v.31, n.1, p.335-341, 2002 (suplemento).

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**, v. 26, n. 5, p. 215 – 218, 2006.

MORRELL, J.M. ; JOHANNISSON, A.; STRUTZ, H. ; DALIN, A.-M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloidal Centrifugation of Stallion Semen: Changes in Sperm Motility, Velocity, and Chromatin Integrity during Storage. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 1 p. 24-32, 2009.

MIRO´ , J.; TABERNER, E.; RIVERA, M.; PEÑA, A.; MEDRANO, A.; RIGAU, T.; PEÑALBA, A. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen **Theriogenology**, n.72, p. 1017–1022, 2009.

NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C. RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial em diferentes concentrações e volumes de espermatozóides criopreservados eqüino. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 33, Suplemento 1, p. 298, 2005a.

NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; ARRUDA, R.P. Efeitos da concentração espermática e volume da palheta nos caracteres de movimento de espermatozóides criopresevados eqüino avaliados pelo sistema computadorizado – CASA. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 33, Suplemento 1, p. 299, 2005b.

NASCIMENTO, J. **Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmáticas , acrossomal e mitocondrial (microscopia de epifluoresencia) de espermatozóides eqüinos criopreservados**, 2006. Tese – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo.

NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ALONSO, M.A.; CELEGHINI, E.C.C; ARRUDA, R.P, Effects of Sperm Concentration and Straw Volume on Motion Characteristics and Plasma, Acrosomal, and Mitochondrial Membranes of Equine Cryopreserved Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.6, 2008.

NEVES NETO, J. R.; FERNANDES, C.B.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F. O. Avaliação estrutural e funcional da célula espermática eqüina frente a diferentes substâncias crioprotetoras. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.32, Suplemento, p. 175, 2004.

Nutricell, Nutrientes Celulares. Disponível em: <<http://www.nutricell.com.br/site2007/produtos/equinos/equinos.html#equinos>>. Acesso em 27 abr. 2009.

OLIVEIRA, R.A. **Índice de prenhez com sêmen congelado de garanhões crioulos usando glicerol ou dimetilformamida como crioprotetores. 2007.** Tese - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

OSORIO, J. P. **Efeito da adição fracionada de dimetil formamida e das curvas de congelamento na viabilidade *in vitro* pós-descongelamento do espermatozóide eqüino**, 2006. Tese- Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

PAGL, R.; AURICH, J. E.; MULLER-SCHLOSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. **Theriogenology**, v.66, p.1115-1122, 2006.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA Jr, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.184- 187, 2002.

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**. v.33, Supl 1, p. 19-27, 2005.

PAPA, F.O.; MELO C.M.; FIORATTI, E.G. ; DELL'AQUA Jr, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. . Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, n.107, p. 293–301, 2008.

PICKETT, B. W. Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility so stallions and Bull spermatozoa. **Fertil Steril**, v.26, p 167-174, 1975.

POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.22, n.1, p.87-95, 1991.

PUGLIESI, G.; DE CARVALHO, G. R.; SARTORI, S. S.; KER, P. G.; OLIVEIRA, R. R. DE; BISPO, C. A. S. **VIABILIDADE E FERTILIDADE DO SÊMEN EQUINO RESFRIADO À 5 °C COM DOIS DIFERENTES DILUIDORES**. **conbravet 2008, anais Gramado – RS ,2008**

KEITH, S.L., **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa**, 1998. p.104 Tese - Colorado State University Fort Collins, Colorado.

KENNEY, R.M., BERGMAN R.V., COOPER W.L., MORSE G.W. Minimal contamination technique for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: ANN. CONV. AAEP.,1975. **Proceedings**. n.21, p.327-336, 1975.

RIBAS, J.A.S.; SILVA, J.F.S.; CUNHA, I.C.N.; QUIRINO, C.R. Variação sazonal das características seminais em cavalos Pantaneiros. -Anais do XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal Curitiba, PR – 31 de maio a 2 de junho de 2007.

SALAZAR JR. J.L.; HAYDEN, S.S.; WAITE, J.A.; COMERFORD, K.L.; EDMOND, A.J.; TEAGUE, S.R. ; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.. Effect of cryopreservation protocol on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, Resumo, p. 46-47, 2008.

SANTOS, S.A.; McMANUS, C.; SERENO, J.R.B.; MARIANTE, A.da S.; SILVA, J.A.; EGITO, A.; ABREU, U.G.P.; COMASTRI FILHO, J.A.; LARA, M.A. Estratégias de conservação *in situ* do cavalo pantaneiro. Corumbá: **Embrapa Pantanal**, doc. 55, p.29, 2003.

SANTOS, S.A.; MAZZA, M.C.M.; SERENO, J.R.B.; MAZZA, C.A.S.; PEDREIRA, A.C.M.S.; MARIANTE, A.A.S.; SILVA, J.A.; MARQUES, M.C. de A.: Sistema de criação de cavalos pantaneiros no pantanal. **Archivos de Zootecnia**, v.53, p. 333-336, 2004.

SILVA, L.A.C. DA; SANTOS, S.A.; SILVA, RAS; MCMANNUS, C.; PETZOLD, H. Adaptação do Cavalo Pantaneiro ao estresse da lida diária do gado no Pantanal, Brasil.- **Archivos de Zootecnia**, v.54, p.509-513, 2005.

SILVA, K.M.G. LEITAO, M.C.G. SILVA, E.C.B. MONTEIRO Jr, P.L.J. CHAVES, M.E.C. LIMA FILHO, J.L. PORTO, A.L.F. GUERRA, M.M.P. Influência da estação do ano nas proteínas de membrana plasmática do espermatozóide de garanhões. -Anais do XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal Curitiba, PR – 31 de maio a 2 de junho de 2007.

SILVA FILHO, J.M; VALLE, G.R.; VIANA, W.S.; VIANNA, L.R.; PALHARES, M.S. Utilização de manequim para coleta de sêmen eqüino e sua influência sobre características reprodutivas do garanhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51 n.5 , 1999.

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

U.F.V Universidade Federal de Viçosa. Sistema para análises estatísticas, **SAEG**, 1993.

VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. **Theriogenology** n.70, p. 448–462, 2008

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

ZIMMERMANN, M. F. **Efeito da diluição do crioprotetor dimetilformamida em amostras de sêmen eqüino descongeladas utilizando-se dois diferentes diluentes comerciais**, 2007.f. Tese - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

ZÚCCARI, C.E.S.N.; NUNES, D.B.; CORRÊA FILHO, R.A.C. Eficiência reprodutiva de éguas da raça pantaneira durante as estações de monta 1995/2000. **Archivos de zootecnia**, v. 51, n. 193-194, p.139-148 2002.

ZÚCCARI, C.E.S.N.; NUNES, D.B.; PAULA, F. A. L.; FERREIRA, C. S.; SILVA, E. V.C. Recongelação do sêmen de garanhões pantaneiros. In. IV SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO – ECONÔMICO DO PANTANAL. 2004, Corumbá- MS. **ANAIS**. Corumbá, 2004.

WAITE, J.A. ; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; TEAGUE, S.R.; SALAZAR JR., J.L.; MANCILL, S.S.; VARNER, D.D. Factors impacting equine sperm recovery rate and quality following cushioned centrifugation. **Theriogenology**. n 70, p. 704–714, 2008.

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

WEBB, G. W.; DEAN, M.M.. Effect of Centrifugation Technique on Post-storage Characteristics of Stallion Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**. V. 29, n. 9, p. 675 - 680, 2009.

WEBB, G. W.; DEAN, M.M.; HUMES, R.A.; HEYWOOD, J.S. A Comparison of the Ability of Three Commercially Available Diluents to Maintain the Motility of Cold Stored Stallion Semen. **Journal of Equine Veterinary Science** . v. 29, n.4, p. 229 – 232, 2009.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)