

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ÍNDICE DE PRENHEZ COM SÊMEN CONGELADO DE
GARANHÕES CRIoulos USANDO GLICEROL OU
DIMETILFORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rodrigo Arruda de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**ÍNDICE DE PRENHEZ COM SÊMEN CONGELADO DE
GARANHÕES CRIoulos USANDO GLICEROL OU
DIMETILFORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES**

por

Rodrigo Arruda de Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antonio Mondino Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**ÍNDICE DE PRENHEZ COM SÊMEN CONGELADO DE GARANHÕES CRIoulos
USANDO GLICEROL OU DIMETILFORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES**

elaborado por
Rodrigo Arruda de Oliveira

como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina
Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Carlos Antonio Mondino Silva, Dr.
(Presidente/Orientador)

Adriana Pires Neves, Dra. (UFRGS)

Karin Erica Brass, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 27 de Fevereiro de 2007.

AGRADECIMENTOS

Meus maiores agradecimentos a Deus, pois sem a Sua infinita ajuda e a intercessão de Nossa Senhora Aparecida, não poderia ter chegado aqui.

Aos meus pais; Minervino e Goiany, grandes incentivadores nos momentos mais difíceis. Aos meus irmãos; Guilherme e Thaís e ao seu marido Alexandre, pela compreensão da minha ausência nos momentos mais importantes de suas vidas e que sempre acreditaram e apostaram na minha profissão!

Ao meu afilhado Lucas, que um dia poderá ler todo esse trabalho!

Ao Prof. Carlos Antonio Mondino Silva pela orientação, ensinamentos, amizade e auxílio em todos os momentos.

À Prof. Mara pela co-orientação, apoio e conselhos.

Aos proprietários das Cabanhas de Uruguaiana e Barra do Quaraí por cederem os animais do trabalho e aos seus respectivos funcionários pela ajuda na realização do experimento.

Aos pós-graduandos e estagiários do Embryolab, que mais que colegas foram meus amigos, irmãos, uma família, durante o convívio em Santa Maria, ao Luiz Fernando, Fabrício Mozzaquatro, Sandra Pozzobon, Jordana Beal, Vivian Campos, Gustavo Winter, Juliano Calegari, Gilson Pessoa, Rodrigo Navarro, Andrey Mayer, Márcia Vendrúsculo, Roberta Cocco, Bruna Ende, Luciana Bortoluzzi, Robinson Worst, Luciano Mello, Franciele Costa, Jenifer Marques e Clarissa Strieder.

Aos colegas de pós-graduação, Caroline Wolf, Andressa Bueno e Luciano Sandri.

Aos Médicos Veterinários Fabrício Correa, André Correa, Leandro Amaral, Fernando Velo, Marcelo Napoleão e Flavio Almeida.

Aos amigos e Médicos Veterinários que tanto ajudaram nesta importante etapa, seja com informações ou simplesmente com a amizade: Carlos Augusto Salvagni, Luciana Bochio e Karen Leão.

À todos os colegas e amigos conquistados durante o curso e estadia no RS.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ÍNDICE DE PRENHEZ COM SÊMEN CONGELADO DE GARANHÕES CRIoulos USANDO GLICEROL OU DIMETILFORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES

AUTOR: RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA
ORIENTADOR: CARLOS ANTONIO MONDINO SILVA
CO-ORIENTADORA: MARA IOLANDA B. RUBIN
Santa Maria, 27 de Fevereiro de 2007

Durante a estação reprodutiva natural de 2005 e 2006 do hemisfério sul, 104 éguas Crioulas foram utilizadas para avaliar a fertilidade do sêmen congelado de cinco garanhões Crioulos. Como diluente usou-se FR4 (Nutricell, Brasil) com 5% de glicerol (GLI) ou 5% de dimetilformamida (DMF) como crioprotetores. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL (100×10^6 espermatozoides/palheta). Examinou-se as éguas em dias alternados por ultra-sonografia transretal para detecção de folículos ≥ 30 mm de diâmetro, quando recebiam hCG (2500UI i.v.). Após 24h eram examinadas diariamente no Experimento I e a cada 6h no Experimento II. As inseminações com sêmen congelado eram realizadas no fundo do corno *ipsilateralis* ao folículo dominante. Nas controle, com sêmen fresco no corpo uterino. Utilizou-se um ciclo estral/animal. O diagnóstico de gestação foi conduzido por ultra-sonografia no 15º dia pós-ovulação. No experimento I, a taxa de prenhez foi 11,9% (5/42) e 62,5% (20/32), respectivamente para DMF e sêmen fresco ($P < 0,0001$). No experimento II, a taxa de prenhez foi 40% (4/10), 10% (1/10) e 70% (7/10), respectivamente para DMF, GLI ($P > 0,05$) e sêmen fresco ($P < 0,0001$). Demonstrou-se que o GLI e a DMF podem ser utilizados como crioprotetores para o congelamento do sêmen de garanhões Crioulos. Neste contexto, a DMF apresentou melhores resultados.

Palavras - chave: Eqüino, sêmen congelado, dimetilformamida, glicerol, crioulo.

ABSTRACT

Master's Dissertation in Veterinary Medicine
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

PREGNANCY RATES USING FROZEN SEMEN OF CRIOLLO STALLION'S WITH GLYCEROL OR DIMETHYLFORMAMID AS CRYOPROTECTANTS

AUTHOR: RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA
ADVISER: CARLOS ANTONIO MONDINO SILVA
CO-ADVISER: MARA IOLANDA B. RUBIN
Santa Maria February 27, 2007.

During the 2005 and 2006 southern hemisphere natural breeding season, 104 Criollo mares were used to evaluate deep frozen semen fertility from 5 Criollo stallions. FR4 was used as extender (Nutricell, Brazil) with 5% glycerol (GLY) or 5% dimethylformamid (DMF) as cryoprotectants. Semen was loaded in 0.5mL straws (100×10^6 spermatozoa/straw). Mares were examined every other day by ultrasonography until detection of ≥ 30 mm diameter follicles, when hCG was injected (2500UI i.v.). After 24 hours, mares were examined daily in Experiment I, and every 6 hours, in experiment II. Insemination with frozen semen was performed deep in the uterine horn *ipsilateralis* to the dominant follicle. Controls were inseminated with fresh semen in the body of the uterus. Only one estrus period per mare was used. Pregnancy diagnosis through ultrasonography was performed on the 15th day post-ovulation. In experiment I, pregnancy rates were 11.9% (5/42) and 62.5% (20/32), respectively for DMF and fresh semen ($P < 0.0001$). In experiment II, pregnancy rates were 40% (4/10), 10% (1/10) and 70% (7/10), respectively for DMF, GLY ($P > 0.05$) and fresh semen ($P < 0.0001$). It was showed that GLY and DMF can be used for frozen of Criollo Stallion's semen. In this context DMF brought better results.

Key words: Equine, frozen semen, dimethylformamid, glycerol, criollo.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Efeito da aplicação de 2500UI de hCG após detecção de folículos ≥ 30 mm de diâmetro nas éguas inseminadas com sêmen congelado no experimento II	32
---	----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Taxa de prenhez no 15º dia de éguas mestiças crioulas inseminadas artificialmente com sêmen congelado (dimetilformamida) e sêmen fresco (controle) de três garanhões da raça Crioula no município de Uruguaiana/RS nos meses de Outubro a Dezembro de 2005	33
FIGURA 2 - Taxa de prenhez no 15º dia de éguas mestiças crioulas inseminadas artificialmente com sêmen congelado (dimetilformamida ou glicerol) e sêmen fresco (controle) de dois garanhões da raça Crioula no município de Barra do Quaraí/RS nos meses de Outubro a Dezembro de 2006	34

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO 1 - Valores médios do exame imediato dos 5 congelamentos de cada
garanhão utilizados nos 2 experimentos e o número de porções produzidas.....45
- ANEXO 2 - Composição do meio de centrifugação Glicose-EDTA.....46

SUMÁRIO

FOLHA DE ROSTO	1
FOLHA DE APROVAÇÃO	2
AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE ANEXOS	8
SUMÁRIO	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 A célula espermática	12
2.2 Criopreservação	13
2.3 Interações dos componentes dos diluentes com a célula espermática...	16
2.3.1 Açúcares	16
2.3.2 Gema de ovo	17
2.3.3 Leite	17
2.3.4 Tampões	17
2.3.5 Crioprotetores	18
2.4 Lesões espermáticas causadas pela criopreservação	18
2.5 Inseminação artificial	21
3. CAPÍTULO 1. Índice de prenhez com sêmen congelado de garanhões Crioulos usando glicerol ou dimetilformamida como crioprotetores	24
3.1 Resumo	25
3.2 Abstract	25
3.3 Introdução	26
3.4 Material e método	27
3.5 Resultados e discussão	29
3.6 Referências	34
4. CONCLUSÕES	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1 INTRODUÇÃO

Na eqüinocultura mundial se expande a utilização do sêmen congelado, devido a recente liberação do seu uso por grande parte das associações de criadores. Entretanto, a fertilidade do sêmen congelado ainda é baixa, e isto dificulta a sua utilização em larga escala (AMANN & PICKETT, 1987; ALVARENGA & LEÃO, 2002; HENRY et al., 2002).

Nos mamíferos, o congelamento e descongelamento de sêmen levam a um decréscimo no percentual de espermatozóides viáveis, pelos danos produzidos na membrana plasmática reduzindo a fertilidade (HAMMERSTEDT et al., 1990). Uma alteração freqüentemente encontrada nos espermatozóides pós-descongelamento, é a perda da integridade da membrana plasmática, o que se reflete diretamente na sobrevivência e na capacidade de fertilização dos espermatozóides (HENRY et al., 2002). Um dos principais fatores limitantes para a aplicação do sêmen congelado em eqüinos está relacionado a particularidades da espécie como as diferenças entre os garanhões e entre os ejaculados de um mesmo garanhão, na capacidade dos espermatozóides para tolerar o processo de congelamento e descongelamento (VIDAMENT et al., 1997), assim como na variação de duração do cio nas éguas.

Os crioprotetores quando adicionados ao meio de congelamento, promovem a desidratação da célula espermática e permitem que ela se rehidrate adequadamente durante o descongelamento. As características físico-químicas ideais que um agente crioprotetor deve possuir incluem baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e principalmente, baixa toxicidade celular (NASH, 1966).

Ashwood-Smith (1987), relatou diferentes componentes como etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol, polietilenoglicol, dimetilsulfóxido e, também as amidas dentre elas, a dimetilformamida, como substâncias que podem ser usadas como agentes crioprotetores para o congelamento de sêmen.

Em 1954, Lovelock & Polge propuseram o mecanismo de ação do glicerol por suas propriedades coligativas, depressão do ponto de congelamento e a conseqüente queda da concentração de eletrólitos das frações não congeladas da solução, protegendo as células espermáticas dos efeitos nocivos da solução super saturada durante o processo de congelamento.

As amidas apresentam três sítios de ligação de hidrogênio com a molécula de água, a metade em comparação ao glicerol. No entanto, por possuírem menor viscosidade e solubilidade em água em relação ao glicerol, permitem maior permeabilidade da membrana (NASH, 1966), diminuindo a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico causados pelos crioprotetores (BALL & VO, 2001).

As éguas inseminadas com sêmen congelado são examinadas com maior frequência e inseminadas o mais próximo da ovulação, pois os espermatozoides viáveis provenientes de sêmen congelado não sobrevivem por muito tempo no trato reprodutivo feminino, quando comparados aos do sêmen fresco ou resfriado (PACE & SULLIVAN, 1975; BARBACINI et al., 2000).

No Brasil, o cavalo Crioulo ocupa o terceiro lugar em número de produtos registrados e, até o presente momento, não existem informações sobre o padrão de congelamento e a fertilidade do sêmen criopreservado dessa raça. A variabilidade de resultados observada com sêmen congelado de outras raças e com diferentes crioprotetores indica a necessidade de estudos relacionados a esta biotécnica para que a inseminação com sêmen congelado/descongelado possa ser aplicada em larga escala.

Por esta razão, avaliou-se a taxa de prenhez na inseminação artificial (IA) com sêmen congelado de garanhões Crioulos utilizando-se como crioprotetores 5% de glicerol ou 5% de dimetilformamida, efetuando-se a IA com auxílio de uma pipeta flexível, no fundo do corno uterino *ipsilateralis* ao folículo dominante comparada a um grupo controle onde as inseminações foram realizadas no corpo do útero com sêmen fresco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A célula espermática

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

O modelo básico das membranas biológicas, segue a organização estrutural de bicamada de fosfolípidios com proteínas associadas, descrito em 1972 por Singer & Nicolson. O mesmo modelo é também observado nas membranas espermáticas (WATSON, 1981).

Nos espermatozoides, o duplo folheto não é simplesmente, uma bicamada passiva de membrana lipídica em que receptores recebem seus sinais moleculares específicos, mas sim, uma estrutura altamente especializada. Assume um papel ativo na capacidade fertilizante, recebendo sinais e modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, trânsito e armazenamento no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, finalmente, capacitação e penetração do oócito (O'RAND, 1982; HOLT, 1995).

O padrão definitivo de lipídeos dos espermatozoides de um ejaculado só é estabelecido após a maturação epidimária (HOLT, 1984; WATSON, 1995). Holt (1984) sugeriu que, além das modificações da superfície celular, relatadas como de maior importância neste processo, ocorrem ainda modificações no interior da MP dos espermatozoides durante sua passagem pelo epidídimo como modulação da fluidez, da permeabilidade e da mobilidade das proteínas integrais das membranas.

Fatores externos às células espermáticas, tais como, alterações na composição, pH, temperatura e osmolaridade do meio que as circunda, podem provocar alterações irreversíveis em suas membranas limitando a função fertilizante dos espermatozoides (WATSON, 2000).

O espermatozoide é uma célula alongada, formada por duas regiões altamente especializadas: a cabeça, na qual está contido o DNA e o acrossomo, vital para a interação espermatozoide-oócito, e o flagelo, envolvido com a motilidade da

célula. Neste, encontra-se a peça intermediária, contendo as mitocôndrias relacionadas com a produção de energia. A cabeça do espermatozóide, além do núcleo, contém pequena quantidade de citoplasma e, no seu extremo apical, o acrossomo, uma vesícula contendo enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração na zona pelúcida (YANAGIMACHI, 1994).

O núcleo é extremamente condensado e provavelmente contém pouca quantidade de água, restando como localização para este líquido os espaços entre a membranas plasmática e acrossomal externa ou dentro de estruturas como o acrossomo e a mitocôndria (AMANN & PICKETT, 1987).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóide para o oócito, onde a união dos pronúcleos masculino e feminino ocorre, produzindo o zigoto (EDDY & O'BRIEN, 1994). Desta forma, a função principal da cabeça do espermatozóide é a liberação de uma série haplóide de cromossomos para o oócito; enquanto a do flagelo, é promover a motilidade da célula para permitir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e a penetração através da zona pelúcida do oócito (MORTIMER et al., 1997).

A membrana plasmática tem permeabilidade seletiva e atua como uma barreira, mantendo, assim, diferenças de composição intra e extra celular. Danos nesta estrutura, podem levar a perda da homeostase com posterior morte celular (AMANN & PICKETT, 1987). Portanto, a integridade da membrana plasmática exerce papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e na manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS & GRAHAM, 1992).

Nos dois terços anteriores da cabeça, há um capuz espesso, chamado acrossomo, que é formado, a partir do aparelho de Golgi. Este contém uma quantidade de enzimas semelhantes as encontradas nos lisossomos da célula típica, inclusive a hialuronidase, que podem digerir filamentos de proteoglicanos dos tecidos, e enzimas proteolíticas. Estas enzimas desempenham papel importante para que ocorra a penetração do material genético masculino no oócito (GYTON & HALL, 1997).

2.2 Criopreservação

Vários fatores devem ser considerados no congelamento de sêmen de garanhões, como por exemplo: exposição dos espermatozóides ao resfriamento, danos causados pelos cristais de gelo e mudanças intracelulares devido à desidratação (AMANN & PICKETT, 1987).

Para que o espermatozóide fertilize o oócito, deve preservar quatro atributos gerais após o congelamento e descongelamento: metabolismo para produção de energia; motilidade progressiva; enzimas, localizadas no acrossoma e proteínas na membrana plasmática, importantes para a sobrevivência do espermatozóide dentro do trato reprodutivo feminino e para a ligação do mesmo com a membrana plasmática do oócito para a fertilização. A destruição de componentes da célula espermática, associada com uma, ou mais dessas funções, reduzirá a fertilidade. Por exemplo, um espermatozóide móvel nem sempre é fértil; espermatozóides móveis usualmente têm adequada produção de energia, mas outro importante aspecto pode ter sido alterado (AMANN & PICKETT, 1987).

Quando uma suspensão de espermatozóides é resfriada abaixo de 0°C, cristais de gelo extracelulares começam a se formar. Isso resulta em aumento da concentração de sais no líquido extracelular. Inicialmente a água do interior do espermatozóide não se congela, mas é resfriada abaixo do ponto de congelamento. A água se move do interior do espermatozóide para o meio extracelular, desidratando progressivamente a célula. Se a velocidade de congelamento é muito lenta, o aumento da concentração de sais intracelulares causada pela desidratação pode danificar o espermatozóide; se a taxa de congelamento for muito rápida, cristais de gelo intracelular podem se formar. A taxa de congelamento adequada é um equilíbrio entre esses fatores (AMANN & PICKETT, 1987).

O principal solvente biológico responsável pelo transporte de nutrientes e substâncias químicas é a água que, em seu estado puro, forma cristais a 0°C, enquanto que, a que contém íons e outras substâncias em solução congela a temperaturas mais baixas, dependendo da concentração e natureza desses componentes.

Quando ocorre o congelamento das soluções aquosas, parte da água forma cristais de água pura, tornando a solução restante cada vez mais concentrada (PICKETT & BERNDTSON, 1978). Este processo provoca um aumento da pressão osmótica na célula, uma vez que a concentração total de solutos dentro e fora deve estar sempre em equilíbrio. Em resposta a essa alteração, a água sai da célula e o

soluto entra. O processo cessa, quando a concentração de soluto se eleva o bastante para prevenir futuras transformações de água em gelo (STOREY & STOREY, 1990).

Dessa forma, os danos causados aos tecidos durante os processos de congelamento e descongelamento se devem a: 1) Formação de cristais de gelo intracelulares, que afetam a estrutura da célula; 2) Concentração de soluto resultante do processo de desidratação, que ocorre durante o congelamento tanto no meio extra como intracelular e interação entre esses dois fatores. A natureza exata dos danos causados pelo congelamento aos tecidos, ainda não está totalmente esclarecida. Aparentemente, o dano causado é uma consequência da pressão diferencial de vapor entre o gelo e a água, a temperaturas abaixo de 0°C. Uma grande pressão de vapor de água poderia causar redistribuição, levando à lesão por desidratação durante o congelamento lento e à ruptura das membranas celulares durante o congelamento rápido (PICKETT, 1986).

Se a redução do volume celular atingir um mínimo crítico, a bicamada de fosfolípidos da membrana celular fica muito comprimida e sua estrutura se quebra. Com isso, as funções de transporte e proteção da membrana não podem ser mantidas. Ao mesmo tempo, rupturas da membrana promovem uma ponte para entrada do gelo extracelular para o interior da célula (STOREY & STOREY, 1990). Dessa forma, para que uma substância tenha boa ação crioprotetora, deve atuar elevando a osmolaridade intracelular, para controlar a desidratação e ainda interagir com a membrana celular, estabilizando-a (MERYMAN, 1974).

Mazur (1970), Meryman et al. (1977), McGann (1978) e Jondet et al. (1984) consideraram que o mecanismo de ação dos crioprotetores, baseia-se principalmente na promoção da redução do ponto de solidificação da solução no congelamento, promovendo um maior tempo para a desidratação da célula, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares.

Uma segunda função do crioprotetor parece ser sua interação com a membrana celular exercendo ação estabilizadora durante as mudanças de um estado líquido para o sólido e vice-versa no descongelamento. Outra possível ação dos crioprotetores, é a de diminuir os efeitos das altas concentrações osmóticas durante a desidratação celular. Muitas moléculas se dissolvem na mistura de crioprotetor e na água, tornando-se menos lesivas do que quando dissolvidas em altas concentrações em um líquido na ausência do crioprotetor (SEIDEL Jr, 1986).

Apesar dos efeitos benéficos do crioprotetor, não existe uma técnica de criopreservação celular que permita 100% de sobrevivência após o congelamento e descongelamento. Existem duas razões para justificar as falhas na ação dos crioprotetores: primeiro, a toxicidade do crioprotetor limita a concentração em que este pode ser utilizado antes do resfriamento e, portanto, limita a eficácia da ação crioprotetora (FAHY, 1986); segundo, os agentes crioprotetores podem ter uma ação direta na produção de danos, alterando a polaridade do meio extracelular e lesando as membranas (ARNOLD et al., 1983).

2.3 Interações dos componentes dos diluentes com a célula espermática

Um protocolo de preservação adequado deve manter o potencial fertilizante das células espermáticas que deverão, ao final de todo o processo, apresentar a vitalidade necessária para atingir o local da fertilização e estarem aptas a concluir a capacitação e a reação acrossomal, que constituem o estágio final de maturação espermática e possibilitam a fecundação de um ócito (WATSON, 1995).

Tanto para a refrigeração como para o congelamento do sêmen, diluentes são utilizados com o intuito de proteger os espermatozóides de todos os efeitos críticos do processo de congelamento. Para tanto, deverão ser adicionadas, aos diluentes, macromoléculas como lipoproteínas e fosfolípidos que atuarão como estabilizadores da membrana plasmática e como crioprotetores. Devemos ainda fornecer fonte de nutrientes para o metabolismo espermático e meio tampão para a manutenção do pH. A produção de um diluente está sempre voltada para a obtenção da estabilização dos componentes da membrana plasmática (PARKS & GRAHAM, 1992; JASKO, 1994).

Holt (2000a) em sua revisão afirmou existirem diferenças na composição lipídica da membrana plasmática entre espécies, raças e ainda entre indivíduos da mesma espécie, sendo talvez, a explicação para que um mesmo meio diluente confira maior ou menor proteção aos espermatozóides de um determinado indivíduo. Silva et al. (1987) consideraram os ganhões como “bons congeladores” e “maus congeladores”, e estas duas classes se diferenciam pela capacidade das células espermáticas tolerarem os efeitos deletérios da criopreservação.

2.3.1 Açúcares

Os açúcares têm sido incluídos nos diluentes para conservação de sêmen a baixas temperaturas como substrato de energia endógena, como componente osmótico e como agente crioprotetor em função do seu alto peso molecular, contribuindo para o equilíbrio osmótico atuando como substitutos de eletrólitos (HOLT, 2000b).

2.3.2 Gema de ovo

O principal efeito protetor ocorre pela diminuição dos efeitos negativos do choque frio estabilizando as membranas espermáticas (HOLT, 2000b). Watson (1979) demonstrou que uma lipoproteína de baixa densidade encontrada na gema do ovo é o fator ativo que protege a célula espermática desse choque, porém o mecanismo de atuação permanece desconhecido.

Em 1981, Watson verificou que a gema de ovo pode conferir diversos graus de proteção aos espermatozoides de diferentes espécies animais, devido, principalmente, a comprovação da existência de distintas composições lipídicas das membranas plasmáticas de diferentes espécies animais.

2.3.3 Leite

McCall & Sorensen (1971) comprovaram a eficácia do leite na criopreservação de sêmen, afirmando que duas substâncias eram responsáveis por esta característica: a lactose, que age como elemento energético, e as proteínas, capazes de potencializar a atividade cinética dos espermatozoides. O leite é um líquido orgânico com importante propriedade biológica para a conservação das células; possui certa capacidade tampão, ação bactericida e viscosidade adequada para a manutenção dos espermatozoides no meio líquido com abundância de carboidratos que seriam utilizados pelas células na produção de energia.

2.3.4 Tampões

O contínuo metabolismo espermático produz como resultado grandes quantidades de catabólitos tóxicos, acarretando aumento do ácido láctico no meio extracelular. Este acúmulo pode causar a morte dos espermatozoides devido a drásticas alterações do pH no meio extracelular, justificando a necessidade de adição de tampões ao diluente (HOLT, 2000b). O fosfato foi primeiramente testado para este fim, porém o citrato de sódio adaptou-se melhor a esta finalidade. O citrato

de sódio aumenta a capacidade de diluição da gema de ovo ao meio líquido, fenômeno que favorece a ação da gema sobre as células (HOLT, 2000b).

2.3.5 Crioprotetor

A adição de crioprotetores ao diluente é essencial para a sobrevivência das células espermáticas após os processos de resfriamento, porém os crioprotetores podem também acarretar danos às células (PARKS & GRAHAM, 1992).

Os agentes crioprotetores são classificados em permeáveis e não permeáveis (NASH, 1966) à membrana citoplasmática. Os crioprotetores não permeáveis são representados por macromoléculas com alto peso molecular, como os açúcares, lipoproteínas da gema do ovo, proteínas do leite e alguns aminoácidos. Estas substâncias são responsáveis pelo mecanismo de proteção no meio extracelular (AMAN & PICKETT, 1987), através de processo osmótico, promovem a desidratação celular durante o congelamento e impedem a formação de grandes cristais de gelo no interior da célula (HOLT, 2000b).

Os crioprotetores permeáveis exercem seu mecanismo de ação nos meios extracelular e intracelular; desempenham importante função no processo de criopreservação. Entre estes se destacam o glicerol, o dimetilsulfóxido, o etilenoglicol, o propanodiol, o butanodiol, o metanol e as amidas. A ação crioprotetora é atribuída a suas propriedades coligativas e ligantes com a água, diminuindo o ponto crioscópico intracelular. Isso aumenta a quantidade de água que permanece no estado líquido sob baixas temperaturas, diminuindo a concentração intracelular de solutos, retardando e limitando a formação dos cristais de gelo (NASH, 1966; HOLT, 2000b).

2.4 Lesões espermáticas causados pela criopreservação

O espermatozóide tem uma diversidade de atributos funcionais altamente diferenciados regionalmente que devem ser mantidos até a fertilização. A criopreservação ideal deve, então, ter o compromisso de preservar o maior número de células possível e a integridade de diferentes estruturas espermáticas (WATSON, 1995).

O resfriamento leva a célula a um estado de quiescência, reduz o metabolismo e proporciona diminuição nos gastos energéticos e na produção de catabólitos tóxicos, contribuindo para a preservação celular. Da mesma maneira que

o congelamento pode diminuir, ou paralisar algumas reações bioquímicas celulares, ele pode também acelerar outras, levando a danos ou mesmo a morte celular (MAZUR et al., 1972; WATSON, 1995; HOLT, 2000b).

O termo estresse térmico, ou choque térmico define um conjunto de alterações ocorridas nos espermatozoides dos mamíferos quando resfriados rapidamente da temperatura corpórea até temperaturas próximas a 5°C, tendo como consequência um decréscimo irreversível da motilidade espermática, mudanças bioquímicas e na função espermática (AMANN & GRAHAM, 1993; JASKO, 1994; HOLT, 2000b).

A redução da temperatura de 37°C a valores próximos de 4-5°C pode levar ao rearranjo de alguns fosfolípidios semelhantes dentro da bicamada da MP, que podem agrupar-se e assumir outras configurações. Com este rearranjo, as propriedades biológicas básicas da membrana plasmática, como permeabilidade seletiva e difusão lateral de proteínas, não são mantidas, alterando a sua função (WATSON, 1981; HOLT, 2000b).

A regulação do influxo de cálcio é claramente afetada pelo resfriamento, sendo, indiscutivelmente, uma das mais graves alterações em termos de função espermática, e, em alguns casos, esta alteração pode ser incompatível com a viabilidade espermática. A entrada de cálcio na célula durante o resfriamento, mimetizando o que ocorre fisiologicamente durante a capacitação, contribui para o início das reações fusogênicas entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa. Watson (2000) relatou a existência de grande similaridade entre os danos verificados na membranas plasmáticas durante o congelamento e as alterações após a reação do acrossomo.

Quanto as lesões estruturais de acrossomo, Alvarenga et al. (1998), avaliando os efeitos da criopreservação no espermatozóide eqüino, relataram discreto espessamento do segmento apical, com freqüente ondulação, além de casos de ruptura da membrana acrossomal externa e conteúdo acrossomal menos denso e homogêneo, ou mesmo a completa ausência do acrossomo em amostras descongeladas.

Os principais fatores que afetam a fluidez característica da membrana plasmática são a composição relativa entre fosfolipídios e colesterol e a temperatura na qual a membrana é exposta. Com a queda da temperatura, os lipídeos passam pela transição de estado líquido para gelatinoso, onde as cadeias de ácidos graxos

organizam-se em um modelo paralelo (HAMMERSTEDT et al., 1990), ficando impossibilitados de se moverem aleatoriamente, resultando na formação de domínios cristalinos, com apenas pequenas regiões de lipídeos no estado líquido, onde ficam aderidas as proteínas (COTTORELLO & HENRY, 2002), produzindo uma estrutura rígida. Deste modo, áreas da membrana plasmática tornam-se fracas, sujeitas a rupturas e permeáveis a íons, como o cálcio. Estes íons contribuem para mudanças no estado de capacitação e nos eventos fusionais, entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, característicos da reação acrossomal (HAMMERSTEDT et al., 1990).

Durante o processo de criopreservação, há formação de cristais de gelo no interior da célula. Quando uma solução contendo concentrações salinas fisiológicas é resfriada abaixo do seu ponto de congelamento, cristais de gelo se formam neste meio. Os cristais que se formam são compostos exclusivamente de moléculas de água e os sais dissolvidos permanecem na porção não congelada da amostra. Com a contínua queda de temperatura, ocorre a cristalização de água, levando ao aumento da concentração de sais na fração não congelada (AMANN & PICKETT, 1987). O aumento da concentração de sais na fração não congelada pode ser prejudicial ao espermatozóide. Altas concentrações de sais podem desidratar a célula espermática, deformando-a (HAMMERSTEDT, 1990), provocando danos à estrutura da membrana, desestruturação e desnaturação das proteínas. Em consequência, os espermatozoides sofrem danos irreversíveis, caracterizados por movimentos anormais (circular ou retrógrado), rápida perda da motilidade, danos ao acrossoma e membrana plasmática, redução do metabolismo e perda de componentes intracelulares (GRAHAM, 1996).

Como o espermatozóide é resfriado na velocidade de -25°C a $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$, a água intracelular não congelada se difunde para fora do espermatozóide devido ao aumento da concentração de solutos na fração de água não congelada extracelular. Isto causa a desidratação da célula com a possibilidade de danos devido à deformação celular (HAMMERSTEDT et al., 1990). No descongelamento, os cristais de gelo extracelulares se descongelam liberando água que dilui as concentrações de sais extracelulares e a água se difunde lentamente para o interior da célula. Este processo restaura o volume celular inicial e dilui as concentrações celulares de soluto aos valores originais (AMANN & PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al., 1990).

Com o declínio constante da temperatura, as células estarão expostas à temperatura de congelamento, e com isto, as células espermáticas serão submetidas a alterações de osmolaridade do meio que as circunda. A água presente no meio extracelular encontra-se sob a forma de solução, com o congelamento de parte desta água, a saturação de solutos aumenta, tornando hipertônico o meio externo. Neste momento, para que o equilíbrio osmótico seja atingido, ocorre efluxo de água da célula para o meio externo. Esta tentativa da célula de equilibrar-se com o meio que a circunda, pode conduzi-la a um efeito deletério devido a grande desidratação e a exposição a um meio extremamente saturado. É o chamado Efeito de Solução, considerado um dos pontos críticos no processo de congelamento das células espermáticas (MAZUR et al., 1972; WATSON, 1981; HOLT, 2000b).

2.5 Inseminação Artificial

Em eqüinos, existe grande interesse em se desenvolver e aprimorar técnicas de inseminação artificial que possibilitem a obtenção de bons índices de fertilidade utilizando baixo número de espermatozóides. A necessidade de elevado número de espermatozóides para a realização da inseminação artificial convencional, onde o sêmen é depositado no corpo do útero das éguas, limita a aplicação do sêmen congelado e sexado (BUCHANAN et al., 1999).

O uso da inseminação artificial acelera o melhoramento genético, viabiliza a obtenção de produtos de reprodutores alojados em outros países, ou até mesmo que já morreram, evita a transmissão de doenças venéreas, facilita a realização de testes de progênie, além de possibilitar que machos subférteis produzam filhos. Entretanto, para que se obtenha sucesso em programas de inseminação artificial são necessários alguns cuidados como a utilização de machos de boa qualidade, adequado controle sanitário e mão de obra especializada (MIES FILHO, 1987).

Usualmente, as éguas são inseminadas com 300 a 500 milhões de espermatozóides móveis, sendo que quando se utiliza sêmen congelado, ou resfriado, o número total de células se aproxima de um bilhão (SQUIRES et al., 1999). Entretanto, poucos destes gametas (1000 a 10.000) terão acesso ao oviduto, fato este resultado da seleção espermática que ocorre durante o transporte uterino (PARKER et al., 1975) e, também, pela junção útero-tubárica (VAZQUEZ et al., 1998). Já foi demonstrado que é possível a obtenção de fertilização utilizando número reduzido de espermatozóides, como mostram os resultados de Carnevale et

al. (1999) que obtiveram 50% de prenhez com a deposição de 500.000 espermatozóides no oviduto de éguas.

Em eqüinos foi demonstrado que a habilidade dos espermatozóides congelados atingirem o oviduto, particularmente a região da ampola, é menor do que de sêmen fresco e esta dificuldade no transporte espermático do sêmen congelado, pode ser devido a alterações bioquímicas e físicas na célula espermática (BADER, 1982).

O local de deposição do sêmen no momento da inseminação é um fator bastante estudado em todas as espécies, pois é de suma importância para obtenção de bons resultados de fertilidade. Na monta natural, o ejaculado é depositado no corpo do útero das éguas (GINTHER, 1992), o mesmo local que se faz a deposição do sêmen em uma inseminação artificial convencional. Este local de deposição é bastante eficiente quando se trabalha com alto número de espermatozóides, mas quando o número é limitado, uma alternativa de aproximação dos gametas ao sítio de fertilização é desejável.

Comumente, os ejaculados de garanhões férteis possuem de 2 a 15×10^9 espermatozóides, os quais, durante a monta natural são depositados diretamente no útero. Devido a contrações do miométrio e motilidade dos espermatozóides o útero é banhado com o sêmen (MORRIS & ALLEN, 2002). Entretanto, após 8 a 20 minutos de contrações, a maioria do ejaculado é eliminada do útero (KATILA et al., 2000) e os espermatozóides que permanecem no útero são encontrados na junção útero tubárica, associados com as células epiteliais do oviduto (MORRIS & ALLEN, 2002).

Buchanan et al. (2000) compararam as taxas de prenhez de grupos de éguas inseminadas com 500×10^6 espermatozóides em 20mL no corpo do útero, 25×10^6 em 1,0mL, 5×10^6 em 1,0mL e 5×10^6 em 0,2mL depositados na ponta do corno através do desvio de pipeta. Os resultados foram respectivamente de 90%, 57%, 30% e 40%, concluindo que a deposição de sêmen no corno uterino pode maximizar a fertilidade quando se utiliza baixo número de espermatozóides em pequeno volume.

A utilização de sêmen congelado representa desafios, considerando que as taxas de prenhez por ciclo obtidas são invariavelmente menores que as obtidas com sêmen fresco ou resfriado dos mesmos garanhões (VANDERWALL, 1997). Martin et al. (1979), reforça a necessidade de doses ao redor de 500×10^6 de espermatozóides com movimento progressivo, pois 30 a 50% dos espermatozóides, são inviabilizados no processo de congelamento e descongelamento.

O transporte espermático e a sobrevivência dos espermatozóides no trato reprodutivo da égua parecem diferir no sêmen fresco e no sêmen congelado. Esta observação, sugere que o sêmen congelado tem vida média consideravelmente menor no trato reprodutivo da égua do que o sêmen fresco (TROEDSSON et al., 1998). O programa de manejo quando da aplicação do sêmen congelado implica exames seriados em intervalos não maiores que 6 a 8 horas, ou ainda, a indução da ovulação através da administração de hormônios (VANDERWALL, 1997).

O procedimento de inseminação na égua, é feito utilizando-se uma pipeta rígida acoplada a uma seringa. A pipeta é guiada pela cérvix com o auxílio do dedo indicador e a deposição do sêmen é efetuada no corpo do útero. Em eqüinos, a inseminação com número reduzido de espermatozóides pelo método convencional apresenta taxas de prenhez geralmente abaixo da expectativa. Este problema pode ser resolvido pela deposição do sêmen mais próximo do sítio de fecundação (FLEURY & CASSOLI, 1999).

Procedimentos não-cirúrgicos baseados na abordagem transcervical para inseminação de reduzido número de espermatozóides no fundo do corno uterino sem o uso de endoscópios, foram igualmente avaliados em eqüinos através de uma pequena modificação na técnica de inseminação convencional (BUCHANAN et al., 1999; FLEURY & CASSOLI, 1999), visando incrementar as taxas de prenhez associadas ao uso do sêmen congelado.

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, resultando na redução do intervalo entre a inseminação e a ovulação. Há dois tipos de hormônios usados para induzir a ovulação em éguas: a Gonadotrofina Coriônica humana (hCG) e o implante de um análogo do GnRH (Desorelina). Tipicamente 2500UI de hCG administrados por via intravenosa em éguas em cio com folículos entre 30-35mm de diâmetro, resulta em ovulações ocorrendo em 92% das éguas até 48h (BARBACINI et al., 2000). Devido a larga 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). Quando corretamente utilizado, a taxa média de prenhez por ciclo com sêmen congelado é de 30-40% (SAMPER et al., 1991). Entretanto, não é incomum encontrar-se taxas de prenhez por ciclo entre 0 e 100% (SAMPER, 2001).

3 CAPÍTULO 1

ÍNDICE DE PREENHEZ COM SÊMEN CONGELADO DE GARANHÕES CRIoulos USANDO GLICEROL OU DIMETILFORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES

**(Pregnancy rates using frozen semen of Criollo stallions with glycerol or
dimethylformamid as cryoprotectants)**

OLIVEIRA R.A.^{1,2}, SILVA C.A.M.³, RUBIN, M.I.B.³, MOZZAQUATRO F.D.M.²,
POZZOBON S.E.², BEAL J.², CALEGARI, J.⁴

¹ MV, Rua 05 Vila Góis, 90, 75120-250 – Anápolis/GO

² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, UFSM/RS

³ DMV, Embryolab – Laboratório de Embriologia Animal Departamento de Clínica de
Grandes Animais, Centro de Ciências Rurais – Universidade Federal de Santa
Maria, 97.105-900 – Santa Maria/RS. Brasil

⁴ Estagiário, Embryolab, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS.
Brasil

Agradecimentos

À Cabanha Santo Ângelo, Estância Itapitocai, Agropecuária Cimarron e
Estância Malke pela disponibilização dos animais, à Hertape Calier pela doação dos
hormônios e ao CNPq pela bolsa de estudos.

ÍNDICE DE PRENHEZ COM SÊMEN CONGELADO DE GARANHÕES CRIoulos USANDO GLICEROL OU DIMETILFORMAMIDA COMO CRIOPROTETORES

RESUMO

Durante a estação reprodutiva natural de 2005 e 2006 do hemisfério sul, 104 éguas Crioulas foram utilizadas para avaliar a fertilidade do sêmen congelado de cinco garanhões Crioulos. Como diluente usou-se FR4 (Nutricell, Brasil) com 5% de glicerol (GLI) ou 5% de dimetilformamida (DMF) como crioprotetores. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL (100×10^6 espermatozoides/palheta). Examinou-se as éguas em dias alternados por ultra-sonografia transretal para detecção de folículos ≥ 30 mm de diâmetro, quando recebiam hCG (2500UI i.v.). Após 24h eram examinadas diariamente no Experimento I e a cada 6h no Experimento II. As inseminações com sêmen congelado eram realizadas no fundo do corno *ipsilateralis* ao folículo dominante. Nas controle, com sêmen fresco no corpo uterino. Utilizou-se um ciclo estral/animal. O diagnóstico de gestação foi conduzido por ultra-sonografia no 15º dia pós-ovulação. No experimento I, a taxa de prenhez foi 11,9% (5/42) e 62,5% (20/32), respectivamente para DMF e sêmen fresco ($P < 0,0001$). No experimento II, a taxa de prenhez foi 40% (4/10), 10% (1/10) e 70% (7/10), respectivamente para DMF, GLI ($P > 0,05$) e sêmen fresco ($P < 0,0001$). Demonstrou-se que o GLI e a DMF podem ser utilizados como crioprotetores para o congelamento do sêmen de garanhões Crioulos. Neste contexto, a DMF apresentou melhores resultados.

Palavras - chave: Eqüino, sêmen congelado, dimetilformamida, glicerol, crioulo.

PREGNANCY RATES USING FROZEN SEMEN OF CRIOLLO STALLIONS WITH GLYCEROL OR DIMETHYLFORMAMID AS CRYOPROTECTANTS

ABSTRACT

During the 2005 and 2006 southern hemisphere natural breeding season, 104 Criollo mares were used to evaluate deep frozen semen fertility from 5 Criollo stallions. FR4

was used as extender (Nutricell, Brazil) with 5% glycerol (GLY) or 5% dimethylformamid (DMF) as cryoprotectants. Semen was loaded in 0.5mL straws (100×10^6 spermatozoa/straw). Mares were examined every other day by ultrasonography until detection of ≥ 30 mm diameter follicles, when hCG was injected (2500UI i.v.). After 24 hours, mares were examined daily in Experiment I, and every 6 hours, in experiment II. Insemination with frozen semen was performed deep in the uterine horn *ipsilateralis* to the dominant follicle. Controls were inseminated with fresh semen in the body of the uterus. Only one estrus period per mare was used. Pregnancy diagnosis through ultrasonography was performed on the 15th day post-ovulation. In experiment I, pregnancy rates were 11.9% (5/42) and 62.5% (20/32), respectively for DMF and fresh semen ($P < 0.0001$). In experiment II, pregnancy rates were 40% (4/10), 10% (1/10) and 70% (7/10), respectively for DMF, GLY ($P > 0.05$) and fresh semen ($P < 0.0001$). It was showed that GLY and DMF can be used for frozen of Criollo Stallion's semen. In this context DMF brought better results.

Key words: Equine, frozen semen, dimethylformamid, glycerol, criollo.

Introdução

O armazenamento de sêmen por longo tempo recebeu avanços significativos em meados do século passado, através do uso do glicerol como crioprotetor (Smith e Polge, 1950). O congelamento de sêmen, importante em programas de melhoramento animal, viabiliza a preservação de material genético e pode auxiliar a transpor algumas barreiras da infertilidade masculina. Com exceção da espécie bovina, tem-se obtido baixas taxas de prenhez após IA com sêmen congelado, já que a viabilidade e a fertilidade dos espermatozoides são reduzidas em consequência de lesões durante o processo de congelamento (Watson, 1979).

Várias técnicas têm sido testadas para a criopreservação espermática utilizando diferentes velocidades e meios de centrifugação, curvas e meios de congelamento, crioprotetores e suas concentrações, bem como protocolos de descongelamento. A primeira prenhez com sêmen congelado foi relatada em 1957, por Barker e Gandier.

Em eqüinos, muitos estudos sobre o tema foram desenvolvidos, destacando-se o trabalho de Martin et al. (1979). Outros trabalhos surgiram depois como alternativas ao método original (Papa e Alvarenga, 1984; Neves Neto et al., 1995;

Papa et al., 1998; Alvarenga et al., 1998; Trimeche et al., 1999) mas os resultados não são encorajadores (Holt, 2000). O glicerol ainda é o crioprotetor mais utilizado no congelamento de sêmen de garanhões. Estudos recentes têm demonstrado que o mesmo parece exercer menor proteção ao espermatozóide durante o processo de congelamento quando comparado a diferentes amidas (Hanada e Nagase, 1980; Gomes et al., 2002). Elas possuem menor viscosidade e solubilidade em água em relação ao glicerol, levando a maior permeabilidade da membrana (Nash, 1966) e diminuindo a possibilidade de danos celulares pela alteração osmótica (Ball e Vo, 2001).

Avaliou-se aqui o índice de prenhez do sêmen congelado de garanhões Crioulos utilizando o glicerol ou a dimetilformamida como crioprotetores.

Material e Método

Cinco garanhões da raça Crioula foram utilizados para coleta e congelamento do sêmen. As cento e quatro éguas mestiças Crioulas aqui utilizadas foram retiradas aleatoriamente de rebanhos no município de Uruguaiana e Barra do Quaraí, RS, nas estações reprodutivas de 2005 e 2006. As éguas, com idade entre 5 e 20 anos e pesando de 350 a 460Kg apresentaram o trato reprodutivo clinicamente sadio, quando avaliado através de palpação e ultra-sonografia transretal. Os animais encontravam-se em piquetes com pastagem nativa, sem suplementação alimentar. Diariamente, ovários e útero foram examinados através de palpação retal e ultra-sonografia para controle folicular. As éguas não foram submetidas a rufiação. No experimento I, realizado de Outubro a Dezembro de 2005, 74 éguas foram inseminadas com sêmen congelado com diluente FR4 usando como crioprotetor a dimetilformamida (n=42) e com sêmen fresco (n=32), grupo controle. No experimento II, realizado entre Outubro e Dezembro de 2006, foram utilizados dois crioprotetores (DMF e GLI) com a mesma metodologia de congelamento do experimento I. Aqui, 30 éguas foram inseminadas, com dimetilformamida (n=10), glicerol (n=10) e sêmen fresco (n=10). Nos experimentos I e II, o trato reprodutivo das éguas foi examinado após o início do cio por palpação retal e ultra-sonografia transretal em dias alternados, até a detecção de folículos ≥ 30 mm de diâmetro. Então, o exame era conduzido diariamente para que a inseminação artificial fosse realizada próxima da ovulação. As éguas dos grupos do sêmen congelado que apresentavam um folículo ≥ 30 mm de diâmetro e notável edema uterino no dia do

controle folicular receberam 2500UI de hCG¹ por via endovenosa. No experimento I a inseminação foi conduzida 24h após a indução da ovulação e repetida a cada 24h até a sua constatação. As éguas com folículos ≥ 40 mm no primeiro exame de controle folicular foram imediatamente inseminadas sem aplicação de hCG, sendo o procedimento repetido a cada 24h até o momento da ovulação. No experimento II, após 24h da indução, as éguas foram examinadas a cada 6 horas e inseminadas somente após a detecção da ovulação. As éguas do grupo controle não receberam hCG e foram inseminadas com sêmen fresco a cada 48h até a detecção da ovulação. A coleta de sêmen de cada um dos cinco garanhões foi feita com auxílio da vagina artificial modelo Hannover. Um filtro de *nylon* foi acoplado ao copo coletor para obtenção do sêmen livre da porção gel. Metade do ejaculado foi destinado para a inseminação a fresco (éguas do grupo controle), utilizando-se para isso um diluente a base de leite em pó desnatado, glicose e bicarbonato de sódio². A outra metade do ejaculado foi diluída em solução de EDTA-Glicose para centrifugação. Após centrifugação o pellet formado foi resuspendido e dividido igualmente com meio FR4 + os respectivos crioprotetores.

*Congelamento do sêmen em solução com dimetilformamida*³

Para o congelamento, utilizou-se somente o sêmen que apresentasse uma motilidade progressiva $\geq 60\%$. O ejaculado livre de gel, foi diluído na proporção de 1:1 com EDTA-Glicose e centrifugado a 400g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet formado resuspendido em FR4^{®4} com 5% de dimetilformamida. As palhetas de 0,5mL foram envasadas com concentração 200×10^6 espermatozóides/mL, lacradas e estabilizadas a 5°C, por 1h. A seguir, as palhetas foram distribuídas em uma plataforma posicionada horizontalmente 6cm acima do nitrogênio líquido por 15 minutos, logo após foram imersas no nitrogênio e manipuladas para serem acondicionadas nas raques e imediatamente estocadas no botijão criogênico.

*Congelamento do sêmen em solução com Glicerol*⁵

¹ Vetecor 5000UI – Hertape Calier Saúde Animal S.A. – Juatuba/MG

² Equidil – Embryolab/UFMS – Santa Maria/RS

³ N,N- Dimethylformamid 99% – Sigma-Aldrich - Alemanha

⁴ FR4 – Nutricel Nutrientes Celulares – Campinas/SP

⁵ Glicerina PA – Vetec Química Fina Ltda – Duque de Caxias/RJ

A criopreservação do sêmen foi realizada em meio FR4^{®3} acrescido de 5% de glicerol, em palhetas de 0,5mL com concentração de 200x10⁶ spz/mL.

As inseminações com sêmen congelado foram efetuadas com o uso de uma pipeta flexível^{®6} de 65cm de comprimento, na extremidade do corno uterino *ipsilateralis* ao folículo dominante, com 200x10⁶ espermatozóides totais (2 palhetas). Nas éguas do grupo controle, as inseminações foram realizadas com uma pipeta de inseminação para eqüinos^{®7}. A deposição do sêmen foi conduzida no corpo do útero na dose de 500x10⁶ de espermatozóides com movimento progressivo.

Para avaliação *in vitro* procedeu-se o descongelamento de uma palheta a 37°C por 30s para avaliação da motilidade, com uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C, com auxílio de um microscópio óptico, observando vigor espermático e motilidade progressiva. A avaliação *in vivo* do sêmen foi feita pela taxa de prenhez através da ultra-sonografia no 15º dia pós-ovulação.

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo pacote estatístico SAS (*Software of the statistical analysis system Release 6.12, 1997*). As variáveis comparadas foram: FR4 + glicerol e FR4 + dimetilformamida e grupo controle *versus* percentual de prenhez. Para a análise dessas variáveis foi utilizado um teste não paramétrico, o Chi quadrado (χ^2).

Resultados e Discussão

Após análise dos resultados do experimento I constatou-se a necessidade da utilização de outro crioprotetor para avaliar o padrão de congelamento dos ganhões, pois se sabe que características individuais podem influenciar a resposta dos espermatozóides ao crioprotetor e ao congelamento. Para diminuir a variabilidade entre os ejaculados foram realizados, no mínimo, cinco congelamentos com cada crioprotetor.

⁶ Minitub do Brasil Ltda – Porto Alegre/RS

⁷ Provar Produtos Veterinários – São Paulo/SP

O percentual médio de células móveis na avaliação imediata pós-descongelamento ao microscópio óptico foi de 30% (experimento I) e 40% e 20% (experimento II) para o sêmen congelado com a dimetilformamida e o glicerol, respectivamente. Fica por esclarecer se no presente experimento, a baixa motilidade pós-descongelamento com diluente utilizando glicerol como crioprotetor pode indicar, ou não, se o padrão de congelamento do sêmen dos garanhões Crioulos aqui testados pode ser considerado como de “baixa congelabilidade” para o glicerol, ou se a concentração de espermatozóides por palheta utilizada resultou em algum prejuízo aos espermatozóides quando diluídos usando o glicerol como crioprotetor. A motilidade pós-descongelamento foi superior em todos os garanhões quando se utilizou a dimetilformamida. Os resultados aqui obtidos indicam que as amidas protegem melhor a célula espermática do garanhão no congelamento. Alvarenga et al. (2000) e Medeiros et al. (2002), avaliando diferentes crioprotetores com o ejaculado de 10 garanhões pelo “*computer assisted semen analysis*” (CASA), observaram 42% de células móveis pós-descongelamento com glicerol e 50% com a dimetilformamida, utilizando envase com concentração de 100×10^6 spz/mL. Avaliando 55 garanhões de diferentes raças com 5% de glicerol, ou 5% de dimetilformamida como crioprotetor e com concentração de 200×10^6 spz/mL, Alvarenga et al. (2003) verificaram motilidade progressiva maior com a dimetilformamida (40/55). O percentual de garanhões com motilidade pós-descongelamento superior a 40% foi de 38% (21/55) para o sêmen congelado com glicerol e 80% (44/55) para os animais com a dimetilformamida. Dados que impressionam e que, por isso mesmo, requerem validação.

Da mesma forma, experimentos em diferentes espécies compararam soluções crioprotetoras com amidas e glicerol, evidenciando superioridade das soluções compostas por amidas (Hanada e Nagase, 1980; Tselutin et al., 1995). Esta superioridade pode estar relacionada ao seu suposto mecanismo de ação e baixo peso molecular, quando comparado ao glicerol, produzindo menor agressão osmótica à célula espermática.

A descrição de Picket e Amann (1993) do processo de congelamento e descongelamento causando danos irreversíveis aos espermatozóides e reduzindo o tempo de viabilidade espermática no trato reprodutivo da fêmea indica a dificuldade da obtenção de resultados favoráveis com uso de sêmen congelado nesta espécie. Devido a imensa variação na resposta do sêmen de diferentes garanhões ao

congelamento, deve-se estar atento à utilização de sêmen congelado e que este preencha padrões mínimos de qualidade para uso na inseminação artificial. De posse de um sêmen congelado de boa qualidade, a égua passa a ser encarada como o principal fator de sucesso no manejo do sêmen congelado. Sugere-se, com base nos resultados aqui obtidos, que a inseminação deva ser realizada o mais próximo possível da ovulação e, dentro do possível, que seja feita uma única vez, até 6h após a ovulação. Os resultados obtidos (Experimento II) evidenciaram a importância do controle folicular mais freqüente e da inseminação realizada mais próxima da ovulação, no caso, logo após a ovulação.

Neste experimento, as inseminações foram realizadas no fundo do corno uterino com auxílio de uma pipeta flexível com metodologia similar à preconizada por Fleury e Cassoli (1999). Isso porque, o número de espermatozóides encontrados no oviduto após inseminação no corpo do útero com sêmen congelado é bem inferior (Rigby et al., 2000). A pipeta flexível aqui utilizada serviu para se atingir o sítio de deposição na maioria das inseminações. Sua aplicação adequada depende da experiência do técnico. Houve, entretanto, algumas inseminações de fundo de corno que foram dificultadas pela resistência encontrada na altura da bifurcação do corno uterino, especialmente nas éguas mais velhas. Não estava previsto no delineamento experimental determinar a presença e o grau da lesão provocada pela passagem de pipetas pelo corno uterino. Mas, após a inseminação, a pipeta era inspecionada, não tendo sido encontrada a presença de sangue ou debris que pudessem sugerir trauma; porém, esta possibilidade não deve ser descartada e pode ter contribuído para reduzir a fertilidade nas éguas inseminadas no fundo de corno uterino.

Das 42 éguas inseminadas com sêmen congelado no experimento I, 32 (76,19%) receberam injeção de hCG para indução da ovulação, enquanto que as demais 10 (23,81%) já apresentavam folículos ≥ 40 mm de diâmetro no momento do controle folicular, e, por isso não foram injetadas com hCG. No experimento II, todas as éguas inseminadas com sêmen congelado (20) tiveram a ovulação induzida, ovulando entre 36 e 48h após a aplicação do fármaco (Tab. 1). Esta resposta caracteriza uma indução de ovulação em período tão estreito que induz a sua indicação sempre que se utilizar sêmen congelado. McCue et al. (2004) e Barbacini et al. (2000), utilizaram o mesmo hormônio e dose, e a maioria das éguas tratadas ovularam entre 24 e 48 horas pós-injeção. Essa diferença, se deve, provavelmente, a freqüência e a qualidade dos exames de controle folicular das éguas, apesar do

pequeno número de ciclos observados (n=52). Fica por esclarecer se a utilização de uma raça de menor porte pode ter sido a causa da melhor resposta a uma dose de 2500UI de hCG.

Tabela 1 – Efeito da aplicação de 2500UI de hCG após detecção de folículos ≥ 30 mm de diâmetro nas éguas inseminadas com sêmen congelado no experimento II.

	Período transcorrido entre injeção e ovulação			
	24-30h	30-36h	36-42h	42-48h
Éguas: n (%)	3 (15%)	0 (0%)	8 (40%)	9 (45%)

No experimento I, das 74 éguas inseminadas (Fig. 1) obteve-se 5 (11,9%) gestações com sêmen congelado com dimetilformamida, enquanto que o grupo de éguas inseminadas com sêmen fresco resultou em 20 gestações (62,5%) ($P < 0,0001$). Vidament et al. (2002), verificaram taxas de prenhez de 46% e 50% em éguas inseminadas a cada 24h com sêmen congelado com o glicerol e dimetilformamida, respectivamente. Medeiros (2003), ao inseminar 30 éguas com 800×10^6 sptz e motilidade total pós-descongelamento de 48% e 18%, obteve 40% (6/15) e nenhuma gestação (0/15) com dimetilformamida e glicerol, respectivamente. A disparidade de resultados parece indicar que ajustes de protocolo de diluição e congelamento são necessários e podem ter prejudicado o congelamento com glicerol.

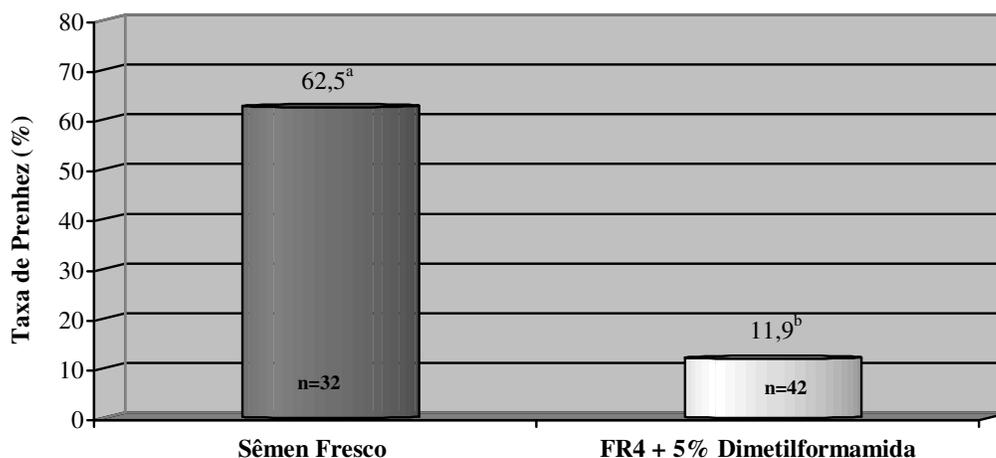


Figura 1 – Taxa de prenhez no 15^o dia de éguas mestiças crioulas inseminadas artificialmente com sêmen congelado (dimetilformamida) e sêmen fresco (controle) de três garanhões da raça Crioula no município de Uruguaiana/RS nos meses de Outubro a Dezembro de 2005 ($P < 0,05$).

No experimento II, obteve-se 40% (4/10) de gestações no grupo DMF (Fig. 2), 10% (1/10) no grupo GLI e 70% (7/10) no grupo controle ($P < 0,0001$). Apesar de não ter havido diferença estatística entre as taxas de prenhez das éguas inseminadas com DMF e das com o sêmen fresco, o número de gestantes foi maior no grupo controle. É possível que o número reduzido de éguas no Exp. II tenha prejudicado a análise estatística. Samper et al., (1991) e Samper (2001) obtiveram resultados semelhantes. Da mesma forma Moffet et al. (2003), verificaram que apesar de não haver diferença na motilidade pós-descongelamento, a taxa de prenhez foi mais alta com dimetilformamida (47%; 14/30) do que com glicerol (14%; 5/34), o mesmo obtido neste trabalho.

O intervalo entre controles de desenvolvimento folicular efetuado de 24 em 24h pode ter sido o principal fator a influenciar o desempenho das inseminações artificiais com sêmen congelado no experimento I. Isso pode ser comprovado pelos resultados obtidos no experimento II, quando os intervalos entre os exames de controle folicular foram de 6 em 6h; se bem que o número reduzido de reprodutoras inseminadas pode ter prejudicado a análise estatística.

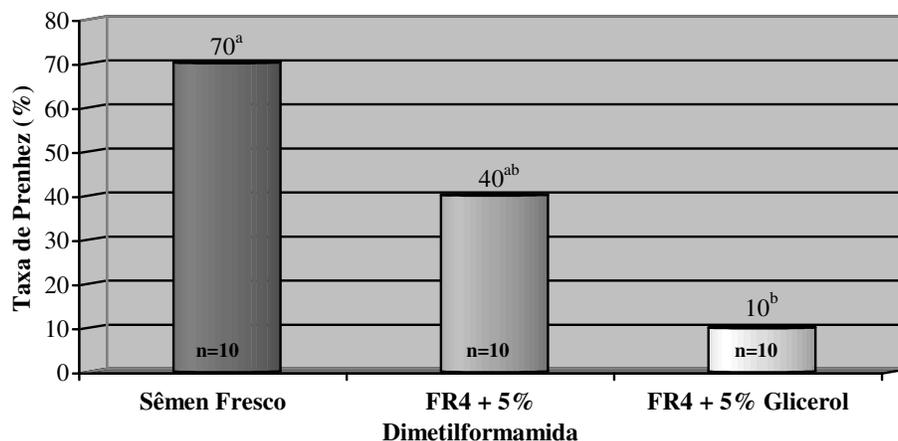


Figura 2 – Taxa de prenhez no 15^o dia de éguas mestiças crioulas inseminadas artificialmente com sêmen congelado (dimetilformamida ou glicerol) e sêmen fresco (controle) de dois garanhões da raça Crioula no município de Barra do Quaraí/RS nos meses de Outubro a Dezembro de 2006 (P<0,05).

Por outro lado, fica por esclarecer até que ponto a concentração de 100×10^6 spz/palheta pode ter influenciado o desempenho do sêmen congelado, o que poderia indicar que uma concentração inferior por palheta deva ser utilizada para o congelamento de sêmen eqüino.

Referências

ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.L.; MOREIRA, R.M. et al. Utilization of ethilene glycol as cryoprotetor for equine semen. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. *Proceedings...* Baltimore: Society for Theriogenology, 1998. p.155.

ALVARENGA, M.A.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. et al. Alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: 14TH INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 2000, Estocolmo. *Proceedings...* Estocolmo: Congress on Animal Reproduction, 2000. p.73.

ALVARENGA, M.A.; LEÃO, K.M.; PAPA, F.O et al. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: WORKSHOP ON TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS, 12., 2003, Brewster, Massachusetts. *Proceedings...* New York: Havemeyer Foundation Monograph Series, 2003. p.74-76.

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

BARBACINI, S.; ZAVAGLIA, G.; GULDEN, V. et al. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination program using frozen semen. *Equine Veterinary Education*, v.2, p.404-410, 2000.

BARKER, A.V.; GANDIER, J.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epidymal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, v.21, p.47-51, 1957.

FLEURY, J.J.; CASSOLI, P.D. Inseminação artificial em eqüino com baixa dose de sêmen congelado. In: ARQUIVOS DA FACULDADE DE VETERINÁRIA UFRGS, 27, 1999, Porto Alegre. *Anais...* Campos do Jordão: XIV reunião anual da SBTE, 1999. p.223

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L. et al. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology*, v.58, p.277-279, 2002.

HANADA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.*, v.60, p.247-252, 1980.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.

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

McCUE, P.; HUDSON, J.J.; BRUEMMER, J.E. et al. Efficacy of hCG at inducing ovulation: A new look at an old issue. In: 50th ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 50., 2004, Denver. *Proceedings...* Lexington: American of Equine Practitioners, 2004. p.510-513.

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

- MEDEIROS, A.S.L. *Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões*. 2003. 96f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Unesp, Botucatu.
- MOFFET, P.D.; BRUEMMER, J.E.; CARD, C.E. et al. Comparison of dimethyl formamide and glycerol for cryopreservation of equine spermatozoa. In: SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY ANNUAL CONFERENCE. *Proceedings...* New York: Society for Theriogenology, 2003. p.42.
- NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERUMAN, H.T. *Cryobiology*. New York: Academic Press, 1966. p.179-220.
- NEVES NETO, J.R.; MERCANTE, C.F.J.; ARRUDA, R.P. Fertilidade do sêmen congelado eqüino em etilenoglicol e glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11,1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.292.
- PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. . Influência de diferentes substâncias como pós-diluentes sobre a motilidade de sêmen congelado de eqüino em teste de resistência térmica a 38°C. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 29, 1984, Belém. *Anais...* Belém: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 1984. p.66.
- PAPA, F.O. et al. A comparative study between the freezability and fertility of stallion semen using diferent extenders. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. *Proceedings...* Baltimore: Society for Theriogenology, 1998. p.155.
- PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1993. Cap.83. p.769-789.
- RIGBY, S.; DERCZO, S.; BRINSKO, S. et al. Oviductal sperm numbers following proximal uterine horn or uterine body insemination. In: 46th ANNUAL AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS CONVENTION, 46, 2000, San Antonio. *Proceedings...*Lexington: American of Equine Practitioners, 2000. p.332-334.
- SAMPER, J.C.; HELLANDER, J.C.; CRABO, B.G. Relation between fertility of fresh and frozen stallion semen and its quality measured as sperm motility and with glass

wool/Sephadex filters. *Journal of Reproduction and Fertility Suppl.*, v.44, p.107-114, 1991.

SAMPER, J.C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal reproduction science*, v.68, p.219-228, 2001.

SAS – Statistical Analysis System. *User's Guide. Versão 6*, SAS INSTITUTE INC. 4.ed. North Caroline, 1997. 846p. SAS user's guide: Statistical Analysis System, Release 6.12, 1997.

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

TRIMECHE, A.; YVON, J.M.; VIDAMENT, M. et al. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.52, p.181-193, 1999.

TSELUTIN, K.; NARUBINA, L.; MAVRODINA, T. et al. Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Science*, v.36, p.805-811, 1995.

VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M. et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethylformamide. *Theriogenology*, v.58, p.249-251, 2002.

WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, v.1, p.283-350, 1979

4 CONCLUSÕES

A dimetilformamida pode ser utilizada como crioprotetor alternativo para o congelamento do sêmen de garanhões Crioulos.

O controle folicular efetuado de 6 em 6 horas é melhor que com intervalos maiores.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, M. A. et al. Utilization of ethylene glycol as cryoprotector for equine semen. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore: Society for Theriogenology, 1998. p.155.

ALVARENGA, M. A.; LEÃO, K. M. Hysteroscopic insemination of mares with low number of frozen thawed spermatozoa selected by percoll gradient. **Theriogenology**, v.58, p.651-653, 2002.

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

AMAN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p.1137.

ARNOLD, K.; PRATSCH, L.; GAWRISH, K. Effect of poly (ethylene Glicol) in phospholipids hydration and polarity of the external phase. **Bioch Biophys Acta**, v.782, p.121-128, 1983.

ASHWOOD-SMITH, M. J. Mechanisms of cryoprotectant action. **Symposia of the Society for experimental biology**, v.41, p.395-406, 1987.

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

BARBACINI, S. et al. Retrospective study on the efficacy of hCG in an equine artificial insemination program using frozen semen. **Equine veterinary Education**, n.2, p.404-408, 2000.

BADER, H. An investigation of sperm migration into the oviducts of the mare. **Journal of Reproductive and Fertility Suppl.**, v.32, p.59-64, 1982.

BUCHANAN, B. R. et al. Pregnancy rates in mares following a single insemination with a low number of spermatozoa into the tip of the uterine horn. **Theriogenology**, v.51, p.395, 1999.

BUCHANAN, B.R. et al. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1333-1344, 2000.

CARNEVALE, E. M. et al. Use of noncycling mares as recipients for oocyte transfer and GIFT. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1999, Nashville. **Proceedings...** Nashville: Society for Theriogenology, 1999. p.44.

COTTORELLO, A. C. P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen eqüino (Revisão de literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.26, p.14-25, 2002.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoa. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. Cap.2, p.29-77. New York: Raven Press. 1994.

FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. **Cryobiology**, v.23, p.1-13, 1986.

FLEURY, J. J.; CASSOLI, P. D. Inseminação artificial em eqüino com baixa dose de sêmen congelado. In: ARQUIVOS DA FACULDADE DE VETERINÁRIA UFRGS, 27, 1999, Porto Alegre. **Anais...**Campos do Jordão: XIV reunião anual da SBTE , 1999. p.223.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare**. 2nd ed., Cross Plains WI: Equiservices, 1992. 642p.

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Funções reprodutoras e hormonais masculinas. In: **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.911-923, 1997.

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

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

HOLT, W. V. Membrane heterogeneity in mammalian spermatozoon. **International review of cytology**, v.87, p.159-194, 1984.

HOLT, W. V. The sperm plasma membrane. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HUMAN SPERM ACROSSOME REACTION, PHYSIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL INDUCTION AND TRANSDUCTION PATHWAYS, 1995, France. **Proceedings**... France, 1995.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.53, p.47-58, 2000a.

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

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinária**, v.10, p.156-165, 1994.

JONDET, M.; DOMINIQUE, S.; SCHOLLER, R. Effects of freezing and thawing on mammalian oocyte. **Cryobiology**, v.21, p.192-199, 1984.

LOVELOCK, J. E.; POLGE, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. **Biochemic Journal**, v.58, p.618-622, 1954.

KATILA, T., SANKARI, S., MAKELA, O. Transport of spermatozoa in the genital tracts of mares. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, v.56, p.571-578, 2000.

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

MAZUR, P. Cryobiology: The freezing of biological systems. **Science**, v.199, p.939-949, 1970.

MAZUR, P.; LEIBO, S. P.; CHUI, E. H. Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. **Experimental Cell Research**, v.71, p.345-355, 1972.

McGANN, L. E. Differing actions of penetrating and non penetrating cryoprotecture agents. **Cryobiology**, v.15, p.382-390, 1978.

McCALL, J. P.; SORENSEN, A. M. Evaporated milk as an extender for stallion semen. **AI Digest**, v.12, p.8-10, 1971.

MERYMAN, H. R.; WILLIAMS, R. J.; DOUGLAS, M. S. J. Freezing injury from solution effects and its prevetion by natural or artificial cryoprotection. **Cryobiology**, v.14, p.287-302, 1977.

MERYMAN, H. T. Freezing injury and its prevention in living cells. **Annual Review of Biophysics Bioengineering**, v.3, p.341-363, 1974.

MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6^a ed., v.2, Porto Alegre: Sulina, 1987. 750p.

MORRIS, L. H. A., ALLEN, W. R. An Overview of low dose insemination in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p.206-210, 2002

MORTIMER, S. T. et al. Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.12, p.1006-1012, 1997.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. In: MERUMAN, H.T. **Cryobiology**. New York: Academic Press, 1966. p.179-220.

O'RAND, M. G. Modification of sperm membrane during capacitation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.383, p.392-404, 1982.

PACE, M. M.; SULLIVAN, J. J. Effect of insemination, number of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, v.23, p.115-121, 1975.

PARKER, W. G.; SULLIVAN, J. J.; FIRST, N. L. Sperm transport and distribution in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl.**, v.23, p.63-66, 1975.

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

PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation. In: TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS: SHORT COURSE PROCEEDINGS, 1986, Fort Collins. **Proceedings...** Fort Collins: Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, 1986, p.4.

PICKETT, B. W.; BERNDTSON, W. E. Principles and techniques of freezing spermatozoa. In: SALISBURY, G.W et al. **Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle**. 2nd ed. San Francisco: W.H. Freeman and CO, 1978, p.231-248.

SAMPER, J. C.; HELLANDER, J. C.; CRABO, B. G. Relation between fertility of fresh and frozen stallion semen and its quality measured as sperm motility and with glass wool/Sephadex filters. **Journal of Reproductive and Fertility Suppl.**, v.44, p.107-114, 1991.

SAMPER, J. C. Management and fertility of mares bred with frozen semen. **Animal reproduction science**, v.68, p.219-228, 2001.

SEIDEL, G. E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: THECNQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS: SHORT COURSE PROCEEDINGS, 1986, Fort Collins. **Proceedings...**Fort Collins: Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, 1986, p.6-12.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p.720-731, 1972.

SILVA, C. A. M. et al. Inseminação artificial em eqüinos com sêmen congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.11, p.95-101, 1987.

SQUIRES, E. L. et al. Cooled and Frozen Stallion Semen. Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, 1999. **[Apostila]**.

STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Frozen and alive. **Scientific American**, v.263, p.62-67, 1990.

TROEDSSON, M. H.; LIU, I. K.; CRABO, B. G. Sperm transport and survival in the mare: a review. **Theriogenology**, v.50, p.807-818, 1998.

VANDERWALL, D. K. The challenges of using frozen semen in horse breeding. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1997, Canadá. **Proceeding...** Canadá: Society for Theriogenology, 1997, p.178-179.

VAZQUEZ, J. J. et al. Nonsurgical uterotubal insemination in the mare. In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1998, Baltimore. **Proceedings...** Baltimore: Society for Theriogenology, 1998. p.82-83.

VIDAMENT, M. et al. Equine frozen semen freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v.48, p.907-917, 1997.

WATSON, P. F. The preservation of semen in mammals. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v.1, p.283-350, 1979.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, E. J.; CLARK, A. **The effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981, p.189-218.

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

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

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. Raven press, New York, p.189-317, 1994.

ANEXO 1

Valores médios do exame imediato dos 5 congelamentos de cada garanhão utilizados nos 2 experimentos e o número de porções produzidas

	Garanhão	Volume Coletado (mL)	Volume Congelado(mL)	M.P.	V	C.E. ($\times 10^6$ /mL)	Número Palh./Cong.	MPPD	VPD
Exp. 1	1	69,0	37,6	60%	4	162,00	38	30%	3
	2	52,0	34,6	60%	4	266,80	55	30%	3
	3	44,0	29,0	60%	4	279,22	49	30%	3
Exp. 2	4	37,4	22,4	60%	4	107,00	14	40%	3
	5	32,6	21,6	60%	4	129,00	17	40%	3

M.P= Motilidade progressiva sêmen fresco; V= Vigor sêmen fresco; C.E= Concentração espermática; Palh./Cong.= Número de palhetas por congelamento; MPPD= Motilidade progressiva pós-descongelamento; VPD= Vigor pós-descongelamento.

ANEXO 2

Composição do meio de centrifugação Glicose-EDTA – 1000mL de água ultra-pura

Glicose	59,985	g
Citrato dihidratado de Sodio	3,700	g
EDTA dissodico	3,699	g
Bicarbonato de sódio	1,200	g
pH	6,590	
Osmolaridade	409,000	