

ROGÉRIO FÜRST

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE EQUILÍBRIO, TAXAS DE
CONGELAMENTO E CONCENTRAÇÕES ESPERMÁTICAS NA
FERTILIDADE DO SÊMEN EQUINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

F991e
2006

Fürst, Rogério, 1966-

Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen eqüino / Rogério Fürst. – Viçosa : UFV, 2006. xvi, 96f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 56-65.

1. Eqüino - Reprodução. 2. Sêmen - Criopreservação.
3. Fecundidade. 4. Inseminação artificial. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.10824

ROGÉRIO FÜRST

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE EQUILÍBRIO, TAXAS DE
CONGELAMENTO E CONCENTRAÇÕES ESPERMÁTICAS NA
FERTILIDADE DO SÊMEN EQUINO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 18 de setembro de 2006.



Prof. Eduardo Paulino da Costa
(Co-Orientador)



Prof. José Domingos Guimarães



Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Co-Orientador)



Jefferson Ferreira da Fonseca



Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

*À minha família, meu bem mais precioso.
Aos meus queridos pais, Charles Fürst
(in memoriam) e Eni.
À minha esposa, Martha.
Aos meus irmãos, Marcel, Tabajara,
Charles, Jaqueline e Michela.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Departamento de Zootecnia, por possibilitar a realização deste curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fazenda Baviera e ao Haras EAO, por possibilitar a realização do experimento, por meio do financiamento.

Ao Setor de Eqüideocultura do Instituto de Zootecnia de Colina-SP, como também aos seus pesquisadores Vitor e Flávio.

Ao meu orientador, professor Giovanni Ribeiro de Carvalho, pela paciência e compreensão.

Ao professor Ciro Alexandre Alves Torres, pela amizade e pelo apoio.

Aos professores José Resende e Alberto Lopes Gusmão, do Laboratório de Reprodução Animal do DVT-UFBA, presentes desde os meus primeiros contatos com a área de reprodução animal.

Ao grande amigo, Fernando Antônio de Freitas, funcionário responsável pelo Setor de Eqüideocultura, pela amizade fraterna, pelos conselhos e pela saudável convivência durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Aos companheiros e colegas de pós-graduação, Vitinho, Jeferson, Cláudio, Herbert, Anselmo, Charles, Miller, André Lima, Daniel Schurt, Pedro e Délcio Rocha, exemplos de dedicação, de caráter, de amizade e de simplicidade.

Ao companheiro de todos os dias, médico veterinário Paulo Cezar e Anderson, pelo apoio e pela confiança.

À Celeste, secretária do Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta conquista, meus sinceros agradecimentos.

BIOGRAFIA

ROGÉRIO FÜRST, filho de Charles Fürst e Eni Rodrigues Pinto, nasceu na cidade de Itabuna, Bahia, em 17 de janeiro de 1966.

Em 1992, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Salvador-Ba.

Em 2002, ingressou no Programa de Pós-Graduação, em nível de Mestrado, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, na área de concentração em reprodução animal.

Em agosto de 2002, iniciou o Programa de Pós-Graduação, em nível de Doutorado, do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, na área de concentração em reprodução animal.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Composição e alteração da membrana plasmática durante o processo de resfriamento.....	2
2.2. Danos espermáticos decorrentes da criopreservação	4
2.3. Princípios da criopreservação	5
2.4. Meios diluidores e crioprotetores	7
2.4.1. Crioprotetores não-penetrantes	8
2.4.2. Crioprotetores penetrantes.....	11
2.5. Curva de resfriamento.....	13
2.6. Curva de congelamento	14
2.7. Curva de descongelamento	14
2.8. Avaliação do sêmen para criopreservação	15
2.8.1. Avaliação do sêmen no pré-congelamento	16
2.8.2. Avaliação do sêmen descongelado.....	17

	Página
2.8.3. Avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides	17
2.8.3.1. Coloração supravital.....	18
2.8.3.2. Teste hiposmótico	19
2.8.3.3. Teste de termorresistência (TTR).....	20
2.9. Dose inseminante, local de deposição e fertilidade do sêmen congelado.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Experimento 1 – Efeito de diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação do sêmen eqüino	24
3.1.1. Material e métodos.....	24
3.1.1.1. Animais experimentais	24
3.1.1.2. Avaliação do sêmen pré-congelamento	25
3.1.1.3. Testes complementares.....	25
3.1.1.4. Centrifugação.....	26
3.1.1.5. Resfriamento do sêmen	27
3.1.1.6. Congelamento.....	28
3.1.1.8. Avaliação do sêmen descongelado.....	28
3.1.1.9. Análises estatísticas.....	28
3.1.1.10. Resultados e discussão	29
3.1.1.11. Conclusão	34
3.2. Experimento 2 – Efeito da dose inseminante na fertilidade do sêmen eqüino criopreservado.....	35
3.2.1. Material e métodos.....	35
3.2.1.1. Localização	35
3.2.1.2. Animais experimentais	35
3.2.1.3. Controle da ovulação e inseminações.....	36
3.2.1.4. Concentração da dose inseminante e diagnóstico de gestação	37
3.2.1.5. Análises estatísticas.....	38
3.2.1.6. Resultados e discussão	38
3.2.1.7. Conclusão	44
3.3. Experimento 3 – Efeito de duas taxas de congelamento e dois protocolos de descongelamento sobre o sêmen eqüino criopreservado	45
3.3.1. Material e métodos.....	45

	Página
3.3.1.1. Local e período do experimento.....	45
3.3.1.2. Animais experimentais	45
3.3.1.3. Processamento do sêmen.....	45
3.3.1.4. Curvas de congelamento	45
3.3.1.5. Descongelamento	46
3.3.1.6. Análises estatísticas.....	46
3.3.1.7. Resultados e discussão	47
3.3.1.8. Conclusão	55
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 56
 ANEXO	 66
 ANEXO A – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	 66

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Características do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador (média \pm EPM).....	29
2 Tempo transcorrido entre a colheita e os procedimentos laboratoriais durante o congelamento do sêmen.....	29
3 Valores médios e desvio-padrão das patologias das amostras espermáticas em cada tempo de equilíbrio.....	34
4 Características do sêmen fresco de cinco ejaculados de oito garanhões das raças Mangalarga Marchador e Bretão-Postier (média \pm EPM)	39
5 Efeito da concentração espermática por dose inseminante sobre a taxa de fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado no primeiro ciclo.....	43
6 Características seminais, morfológicas e espermatozóides relativas ao Host e à coloração de vivos/mortos do sêmen fresco de cinco ejaculados de cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador (média \pm EPM).....	48
7 Porcentagem da motilidade espermática nos diferentes tempos do TTR, quando submetida a duas curvas de congelamento e a dois protocolos de descongelamento	49

	Página
8 Vigor do sêmen descongelado nos diferentes tempos do TTR, quando submetidos a duas curvas de congelamento e a dois protocolos de descongelamento.....	49
9 Porcentagem de espermatozoides mortos (corados) no teste supravital e Host submetidos a duas diferentes curvas de congelamento (CH e CV) e dois protocolos de descongelamento (37 e 75 °C)	53
10 Morfologia espermática em sêmen <i>in natura</i> e sêmen eqüino criopreservado da raça Mangalarga Marchador, em dois protocolos de congelamento	53
11 Efeito da concentração sobre a taxa de fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado na curva vertical	54

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Motilidade espermática progressiva total do sêmen descongelado dos três tratamentos (T1, T2 e T3), nos diferentes tempos do teste de termorresistência (TTR). (T1 = tempo de equilíbrio de 25 minutos, T2 = tempo de equilíbrio de 85 minutos e T3 = tempo de equilíbrio de 145 minutos) (P > 0,05)	30
2 Vigor espermático do sêmen descongelado em diferentes tempos de equilíbrio (T1, T2 e T3), dentro de cada tempo do TTR. (T1 = tempo de equilíbrio de 25 minutos, T2 = tempo de equilíbrio de 85 minutos e T3 = tempo de equilíbrio de 145 minutos) (P > 0,05).....	32
3 Porcentagem de espermatozóides mortos (corados) e Host no teste supravital no tempo 0 do TTR, submetidos a três diferentes tempos de equilíbrio (T1, T2 e T3) (P > 0,05)	33
4 Pipeta de inseminação marca Minitub 75 cm	37
5 Porcentagem da motilidade do sêmen congelado de cada garanhão da raça Mangalarga Marchador e Bretão, nos diferentes tempos do teste de termorresistência (TTR).....	41
6 Diferença no vigor do sêmen congelado de cada garanhão da raça Mangalarga Marchador e Bretão, em cada tempo do TTR ..	42
7 Porcentagem média de espermatozóides mortos (corados) nos testes supravital e Host dos garanhões da raça Bretã e Mangalarga Marchador, sêmen descongelado no tempo 0 do TTR (P > 0,05).....	42

	Página
8 Suporte metálico utilizado no congelamento vertical.....	47
9 Taxas de congelamento impostas ao sêmen	52

RESUMO

FÜRST, Rogério, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2006.
Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen eqüino.
Orientador. Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-Orientadores: Ciro Alexandre Alves Torres e Eduardo Paulino da Costa.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de diferentes tempos de equilíbrio, as curvas de congelamento e descongelamento e a concentração espermática por dose inseminante sobre a fertilidade do sêmen eqüino. No Experimento 1, foram utilizados cinco ejaculados de três garanhões da raça Mangalarga Marchador, sendo o grupo experimental dividido em três tratamentos: T1 = tempo de equilíbrio de 25 minutos, T2 = tempo de equilíbrio 1h25 min e T3 = tempo de equilíbrio com 2h25 min, em que a qualidade seminal foi avaliada por testes como supravital, teste hiposmótico (Host), motilidade e vigor espermático progressivo no TTR. A motilidade espermática progressiva avaliada no TTR nos tempos de 0, 20 e 40 minutos não diferiu. Não houve diferença na qualidade do sêmen nos diferentes tempos do TTR ($P > 0,05$). Houve redução de aproximadamente 33% de espermatozóides reativos ao Host após o descongelamento, em comparação aos resultados registrados no sêmen *in natura*, de onde se conclui que o tempo de equilíbrio não tem nenhuma influência na qualidade espermática do sêmen congelado. No Experimento 2, para teste de fertilidade, foram utilizados cinco ejaculados

de seis garanhões da raça Mangalarga Marchador e dois garanhões da raça Bretão-Postier e foram testadas duas concentrações espermáticas por dose inseminante, em que T1 = 300 milhões e T2 = 150 milhões. A taxa de prenhez obtida em 95 estros foi de 54,7% (T1 = 35/64 estros) e 51,6% (T2 = 16/31 estros), e não diferiu das taxas de prenhez registradas nos dois tratamentos ($P > 0,05$). No Experimento 3 foram utilizados cinco ejaculados de três garanhões da raça Mangalarga Marchador, em que foram testados dois protocolos de congelamento, sendo curva horizontal (CH) com taxa de congelamento de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ e curva vertical (CV) com taxa de congelamento de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ e dois protocolos de descongelamento, sendo $37\text{ }^{\circ}\text{C}/30''$ e $75\text{ }^{\circ}\text{C}/7''$. Comparando-se a porcentagem de espermatozóides móveis pós-descongelamento com o sêmen fresco, observaram-se perdas de motilidades progressiva de 28,6% no T0 do TTR; ao final do TTR (90 minutos) este valor não ultrapassou 50%, independentemente dos protocolos de congelamento e descongelamento. Entretanto, queda acentuada na motilidade espermática e no vigor espermático pós-descongelamento para CH, quando comparada aos 40, 60 e 90 minutos do TTR com a CV (39,7% vs 50,23% e 40,2% vs 50%), (36,7% vs 43,7% e 36,3 vs 43,9) e (27,8 vs 35,9 e 25,44 vs 40,86) tanto no descongelamento quanto a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente ($P < 0,05$). Resultados superiores foram obtidos para o vigor. A taxa de prenhez obtida em 25 ciclos para a CV foi de 81,8% para a concentração 300 milhões e de 71,4% para 150 milhões de espermatozóides viáveis no descongelamento.

ABSTRACT

FÜRST, Rogério, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2006.
Effect of different times of balance, freezing rates and concentrations spermatics in the fertility of the semen equine. Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-Advisers: Ciro Alexandre Alves Torres and Eduardo Paulino da Costa

The freezing process cause damages the structural integrity, biochemist and biophysical the plasmatic membrane of the spermatozoon, leading a reduction in the fertility of the semen after the unfreeze. These damages are in consequence the imperfections in the freezing process that it understands since the collection until speed and time of centrifugation; curve of cooling and freezing; balance time; spermatic concentration for inseminated dose and frequency of insemination. The objective of this study was to evaluate the efficiency of alternative method equine semen freezing, as different times of balance, curves of freezing and unfreeze on the fertility of the equine semen. In Experiment 1, five ejaculates of three had been used sires of the race Mangalarga Marchador where the experimental group was divided in three treatments: T1 = time of balance of 25; T2 minutes = 1 time of balance and 25 minutes; and T3 = time of balance with 2 hours 25 minutes, where tests had been evaluated as survival, hypostatic test motilities and vigor in the TTR. The total motilities evaluated by the TTR in the times of 0, 20 and 40 minutes did not differ ($P > 0.05$) between the T1 and the evaluated semen the cool one. It did

not have difference ($P > 0.05$) enter the treatments how much the evaluated motilities in the different times of the TTR, and evaluated vigor inside of each time. It approximately had a reduction of 33% number of reactive spermatozoa to the Host in the unfreeze, comparison to the results found in the cool semen. The structural integrity of the plasmatic membranes was evaluated using the survival test, being the dead spermatozoa had been approximately 36.15% superior in the frozen semen when compared with the cool semen. In Experiment 2 for fertility test one used five ejaculates ones of six sires of the race Mangalarga Marchador and two of the race Breton. Where a curve of freezing T1 was tested and two spermatic concentrations for inseminated dose T1 = 300 million and T2 = 150 million. The tax of gestation gotten in 95 cycles was analyzed getting tax of 54.7% fertility (T1 = 35/64 cycles) e 51.6% (T2 = 16/31 cycles). It did not have difference ($P > 0.05$) between treatments between the treatments. In Experiment 3 five ejaculates of three sires of the race Mangalarga Marchador had been used where it was tested two protocols of freezing, CH (horizontal curve) with one tax of freezing of $-60\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ and CV (vertical curve) with one tax of freezing of $-100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ (extreme-fast) and two protocols of unfreeze $37\text{ }^{\circ}\text{C}/30''$ and $75\text{ }^{\circ}\text{C}/7''$. Comparing it mobile percentage of spermatozoa after unfreeze with the cool semen, had observed losses of next motilities to 28.6% in the T0 of the TTR, to the end of the TTR (90 minutes) this value did not exceed to 50%, independently of the procedure of freezing and unfreeze. However, a fall accented in the motilities and vigor after-unfreeze for CH when compared with the 40, 60 and 90 minutes of the TTR with the CV (39.7% *versus* 50.23% and 40.2% *versus* 50%), (36.7% *versus* 43.7% and 36.3 *versus* 43.9) e (27.8 *versus* 35.9 and 25.44 *versus* 40.86) in such a way in the unfreeze the $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectively ($P < 0.05$). Superior results had been gotten for the vigor. The tax of gestation gotten in 25 cycles for the CV was of 81.8% for the concentration 300 71.4% and million for 150 million viable spermatozoa in the unfreeze.

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen representa uma importante ferramenta no melhoramento genético do animal. Esta biotecnologia maximiza o potencial genético de reprodutor, permitindo o maior número de descendentes de animais de alto mérito genético, a redução nos custos do transporte e a melhoria no controle de doenças sexualmente transmissíveis.

O processo de congelamento causa danos à integridade estrutural, bioquímica e biofísica da membrana plasmática do espermatozóide, resultando em menor fertilidade do sêmen após o descongelamento (KLÖPEE *et al.*, 1988). Atualmente, este ainda é o maior entrave no emprego desta biotecnologia em maior escala, para algumas espécies domésticas.

A tecnologia de criopreservação de sêmen eqüino avançou muito nos últimos anos, no entanto ainda é grande a diversidade de informações sobre as metodologias de criopreservação: meio diluidor; velocidade e tempo de centrifugação; curva de resfriamento e congelamento; tempo de equilíbrio; concentração espermática por dose inseminante; e frequência de inseminação.

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas por dose inseminante sobre a fertilidade do sêmen eqüino criopreservado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O processo de criopreservação do sêmen inclui todas as etapas, desde sua coleta até a manutenção da viabilidade dos espermatozóides, por um determinado período de tempo após o descongelamento (WATSON, 1995). Com o objetivo de melhorar a viabilidade de células e tecidos criopreservados, faz-se necessário o entendimento do efeito das baixas temperaturas sobre sistemas biológicos dentro de cada uma dessas etapas do congelamento.

2.1. Composição e alteração da membrana plasmática durante o processo de resfriamento

Nos organismos eucariotes, o modelo estrutural básico da membrana plasmática é formado por duas camadas de fosfolipídios com proteínas integrais, glicoproteínas de superfície de ligação e glicolídeos organizados em um modelo de mosaico fluido (SINGER e NICOLSON, 1972).

Glicolipídios, fosfolipídios e esféroídes são os principais constituintes lipídicos da membrana plasmática espermática (WATSON, 1995). Parks e Lynch (1992) avaliaram a composição lipídica do sêmen total e da membrana plasmática de espermatozóides de cachoço, touro, garanhão e galo, e dividiram os lipídeos em neutros, glicolipídeos e fração de fosfolipídios, além de esféroídes livres e fosfolipídios ligados a ácidos graxos. O colesterol é o esféroíde encontrado em maior quantidade nas espécies estudadas. Dentre os

fosfolipídeos, a esfingomielina, a fosfatidil-colina e a fosfatidil-etanolamina foram as mais encontradas. Dos ácidos graxos ligados à fração de fosfolipídeos, constatou-se alta proporção de grupos docosapentanóicos e de docosaheptanóicos das espécies de mamíferos e de ácidos graxos de cadeia menor com maior número de saturações no espermatozóide de galo. Os glicolipídeos correspondem a menos de 10% do total de lipídeos polares das membranas plasmáticas das espécies estudadas, devendo-se ressaltar que o maior glicolipídeo observado nos espermatozóides de galo é diferente daquele dos espermatozóides de mamíferos.

Cada tipo de fosfolipídio tem preferência na sua orientação específica dentro da bicamada, assimetria de fosfolipídio, além disto, a quantidade e o tipo de fosfolipídios de membrana mudam de acordo com a espécie animal. Tudo isso pode, de certa forma, estar relacionado à maior ou menor estabilidade da membrana celular (HAMMERSTEDT e GRAHAM, 1992).

A assimetria da bicamada lipídica é importante para a função celular. Em hemácias, esta assimetria é devido à polaridade dos fosfolipídios de membrana que estão concentrados, em sua grande maioria, na camada interna, devido à ação de uma enzima, aminofosfolipede-translocase (VERHOVEN *et al.*, 1992). A alteração na assimetria das células espermáticas é responsável pelo aumento na fluidez da membrana externa dos espermatozóides durante a capacitação (MULLER *et al.*, 1994). Com base nessas informações e sabendo que a atividade enzimática é dependente da temperatura, Watson (1995) sugeriu que o congelamento e o descongelamento podem provocar a quebra da assimetria da membrana.

A membrana plasmática apresenta-se em um estado de fluidez, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções. A fluidez da membrana é afetada principalmente pela composição relativa entre os fosfolipídios e o colesterol e pela temperatura à qual a membrana é exposta. À temperatura ambiente, os lipídeos e as proteínas de membrana permanecem em estado de fluidez, no entanto a contínua queda de temperatura promove alterações físicas da membrana, que passa do seu estado líquido ao de gel; as cadeias de ácidos graxos que estavam aleatoriamente distribuídas ordenam-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida e tornando essas áreas fracas

e suscetíveis a rupturas e a fusões, como também permeáveis a íons (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990).

Os componentes das membranas interna e externa do acrossoma, nuclear e mitocondrial são os elementos mais suscetíveis aos danos causados pela queda da temperatura (GRAHAM, 1992). Segundo Graham (1996), os espermatozoides submetidos ao resfriamento sofrem mudança irreversível, caracterizada por perda de motilidade, danos na membrana acrossomal e plasmática, aumento na permeabilidade, redução do metabolismo e perda de componentes celulares.

Os principais danos sofridos pela célula no processo de criopreservação ocorrem durante os processos de resfriamento e descongelamento. Assim, uma taxa de resfriamento e aquecimento adequada e a adição de diluentes são necessárias para prevenir danos causados à membrana, pelo choque térmico.

2.2. Danos espermáticos decorrentes da criopreservação

O processo de criopreservação ocasiona redução na viabilidade da célula espermática. As lesões ocasionadas neste processo são atribuídas ao efeito da mudança de temperatura sobre a resposta celular à formação de cristais de gelo intracelular; a danos oxidativos a alterações na permeabilidade da membrana do espermatozoide; à toxicidade dos crioprotetores e ao estresse osmótico (WATSON, 2000). O estresse osmótico é associado, principalmente, à adição e remoção de crioprotetores, assim como às alterações na concentração de soluto durante a congelação (WATSON, 2000).

O processo de criopreservação envolve uma série de respostas biofísicas, ainda não completamente compreendidas, das células e dos tecidos. A taxa de sobrevivência espermática ao resfriamento, congelamento e aquecimento depende das taxas de resfriamento e aquecimento utilizadas, do tempo em que a célula permanece em cada etapa, do transporte de substâncias e da formação de cristais de gelo. Contudo, a resposta celular mais importante ao congelamento é dada pela perda de água e pela formação de cristais de gelo intracelular.

Durante o congelamento lento, ocorre inicialmente no meio extracelular, antes que os cristais de gelo sejam formados no meio intracelular (FARRANT,

1980). Com a formação de cristais de gelo no meio extracelular, a água é removida do ambiente extracelular e um gradiente osmótico é formado, levando a passagem de água para fora da célula. Mazur *et al.* (1972) propuseram que durante o congelamento lento o dano celular era causado pelo relativo longo período de tempo em que a célula permanecia exposta às propriedades alteradas dos meios intra e extracelulares, como resultado da formação de gelo. Este fenômeno é conhecido como efeito-solução e inclui os efeitos: de desidratação excessiva; elevada concentração de solutos, solução tóxica à célula; e mudança de pH celular, alterando o metabolismo celular.

Quando a célula é criopreservada em uma taxa de congelamento muito rápida, há a formação de gelo extracelular, levando ao aumento na concentração dos solutos extracelulares de forma muito rápida, não permitindo que a célula desidrate o suficiente, conseqüentemente ocorre maior formação de cristais de gelo intracelular, letais para a célula. Mazur *et al.* (1972) postularam que a formação de cristais de gelo intracelular e o efeito-solução causam danos à célula e que a taxa de congelamento ótima deveria minimizar este efeito.

Os efeitos deletérios dos crioprotetores, por si só, estão relacionados a diversos fatores, dentre os quais podem ser citados: o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, a indução da sua fusão, além da inibição da atividade enzimática (FAHY, 1986), resultando na desnaturação de proteínas e em alterações das interações da actina (FAHY, 1990). Segundo Hammerstedt e Graham (1992), o glicerol é ainda o crioprotetor mais utilizado, pois induz a mudanças nos eventos citoplasmáticos, por aumentar a viscosidade ao penetrar na célula espermática; causa alterações na polimerização da tubulina e na associação dos microtúbulos; resulta no balanço bioenergético, além de atuar diretamente, de modo prejudicial, na membrana plasmática, no glicocálix e nas proteínas de superfície celular.

2.3. Princípios da criopreservação

No processo de criopreservação, o sêmen é inicialmente resfriado à temperatura ambiente (37 a 20° C), o que parece não ocasionar maiores danos aos espermatozoides, quando este se encontra diluído em meio adequado

(KETHH, 1998). Durante a fase de transição da membrana plasmática, de seu estado líquido-cristalino para o estado gel, o espermatozóide está mais suscetível a danos causados pelo resfriamento. Minimizar esse efeito, controlar a taxa de resfriamento entre as temperaturas de 19 a 8 °C, adicionar lipídeos (gema de ovo) ou lipoproteína (leite) ao diluente (GRAHAM, 1996), além do uso de curvas de resfriamento lentas (-0,05 °C/min), são medidas necessárias para diminuir os danos causados pelo frio.

No resfriamento feito de maneira inadequada, o espermatozóide sofre um fenômeno conhecido como choque térmico, que induz a danos irreversíveis aos espermatozoides, caracterizados por alterações nos padrões normais de motilidade (movimento circular ou retrógrado), perda rápida de motilidade e danos no metabolismo e nas membranas plasmática e acrossomal (GRAHAM, 1996; SQUIRES, 1999).

Durante o processo de congelação, a suspensão de espermatozoides atinge temperaturas abaixo do ponto de congelação do meio (super-resfriamento), antes que haja a formação de cristais. Quando os cristais de gelo começam a se formar há o aumento na temperatura, necessário para a cristalização, o que pode vir a ser deletério para o espermatozóide. O uso de curvas adequadas de congelação diminui os efeitos deletérios (SQUIRES, 1999). Na temperatura de 5 °C a água intra e extracelular permanece super-resfriada. Entre -5 e -10 °C, inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular, que permanece super-resfriado, e ocorre mudança no gradiente osmótico entre os meios intra e extracelular, alterando o equilíbrio osmótico e ocasionando a desidratação celular. Neste ponto, a curva de congelação deve ser lenta, para evitar o congelação da água intracelular, e rápida o suficiente para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. A perda de água e a desidratação são eventos desejáveis, pois reduzem a formação de grandes cristais de gelo dentro da célula, o que causa danos às estruturas internas e, ou, a membrana plasmática (SQUIRES, 1999). No entanto, a desidratação severa promove desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, até ocorrer um colapso da membrana (MEDEIROS, 2002).

A descongelação depende da taxa de congelamento do sêmen. Espermatozoides congelados em curvas moderadas necessitam de curvas

adequadas de descongelamento. Neste ponto, o gelo extracelular descongela lentamente, diluindo 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. No sêmen descongelado rapidamente, o gelo derrete depressa e dilui o soluto do meio, permitindo a água entrar muito rapidamente no espermatozóide, o qual se encontra altamente concentrado, danificando o espermatozóide (GRAHAM, 1996).

2.4. Meios diluidores e crioprotetores

Os meios diluidores são constituídos de substâncias que permitem a preservação da membrana plasmática, mediante a estabilização do pH do meio; a neutralização de produtos tóxicos produzidos pelos espermatozoides; a proteção contra o choque térmico; a manutenção do equilíbrio eletrolítico e osmótico; a inibição do crescimento bacteriano; o fornecimento de energia (LINDE-FOSBERG, 1991; ENGLAND, 1993).

Vários estudos têm sido realizados ao longo dos anos, na tentativa de desenvolver o diluidor ideal para preservação do espermatozóide equino. Em geral, os diluidores se dividem em dois grupos, com relação à composição dos seus constituintes: a) à base de leite e derivados (KENNY *et al.*, 1975; DOUGLAS-HAMILTON *et al.*, 1989; PICKETT, 1993) e b) à base de gema de ovo (MARTIN *et al.*, 1979; PALMER *et al.*, 1983; CRISTANELLI *et al.*, 1985).

Os crioprotetores são substâncias capazes de promover a sobrevivência celular durante o resfriamento, congelamento e descongelamento, apesar de o seu mecanismo de ação na criopreservação ainda não estar completamente elucidado. Os crioprotetores podem ser classificados, de acordo com sua permeabilidade à membrana celular, em: não-permeantes, macromoléculas, como as proteínas presentes no leite e na gema de ovo, sacarose, glicose, lactose, manose, rafinose, trehalose dentre outros; e permeantes, pequenas moléculas que atravessam a membrana do espermatozóide e atuam no meio intra e extracelular e incluem glicerol, etilenoglicol e dimetilsulfóxido-(DMSO), 1,2 propanodiol, acetamidas e outras amidas (McKINNON, 1996; LEIBO e BRADLEY, 1999).

Massip (1986) relatou que essas substâncias interagem com a membrana celular, proporcionando estabilização e evitando a sua lesão. Entretanto, os crioprotetores não garantem a sobrevivência de 100% das células, por também possuírem efeitos tóxicos sobre elas, dependendo da concentração utilizada do crioprotetor no meio diluidor (FAHY, 1986). Altas concentrações de crioprotetores são deletérias aos espermatozóides, devido à sua toxicidade, e podem resultar na redução da fertilidade após a inseminação artificial. Embora a função desses agentes seja a de maximizar os efeitos negativos, há evidências de que os crioprotetores são tóxicos para o espermatozóide. Parte da toxicidade é devido à injúria bioquímica, resultado da adição direta do crioprotetor sobre componentes subcelulares, apesar de ocorrerem danos osmóticos (ARRUDA, 2000).

2.4.1. Crioprotetores não-penetrantes

Algumas substâncias, como lipídeos, proteínas e macromoléculas, são eficientes na proteção da célula espermática durante o processo de congelação, sem penetrar na célula, são estes: gema de ovo; leite; açúcares como a frutose, lactose, manose, rafinose e trealose; polímeros sintéticos como polivinilpirrolidona (PVP) e metilcelulose; e albumina sérica bovina (KEITH, 1998). Essas substâncias, quando presentes nos diluidores seminais, tornam o ambiente hipertônico, o que possibilita a desidratação celular e reduz a formação de cristais de gelo no interior da célula. Desta forma, auxilia os crioprotetores penetrantes, portanto reduz a necessidade de grandes quantidades desses agentes e minimiza possíveis efeitos tóxicos.

A gema de ovo tem sido rotineiramente utilizada em protocolos de criopreservação de sêmen de várias espécies, conferindo proteção extracelular à célula espermática. Os fosfolipídios presentes na gema de ovo são os principais responsáveis pela ação protetora sobre a membrana celular contra o choque térmico pelo frio (ENGLAND, 1993). Acredita-se que esta proteção seja devido: 1) à presença de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que aderem à membrana celular durante o processo de criopreservação, ocupando sítios específicos das membranas, tornando-as mais resistentes e preservando a membrana do espermatozóide (QUINN *et al.*, 1980; MOUSSA *et al.*, 2002); e

2) à substituição da perda de fosfolipídios, aparentemente induzindo alteração transitória na composição da membrana plasmática e, conseqüentemente, prevenindo a ruptura da mesma (FARSTARD, 1996). Os fosfolipídios que compõem a fração LDL da gema de ovo protegem o sêmen, especificamente durante o processo de resfriamento até 5 °C. O uso de fosfatidilserina purificada tem demonstrado proteger as células espermáticas de bode e touros contra o choque térmico. Lipossomas que compõem o colesterol e a fosfatidilserina protegem o espermatozóide de bovinos e garanhões dos danos do processo de congelação, possivelmente por prevenir as alterações deletérias durante a criopreservação (ENGLAND, 1993; WILHELM *et al.*, 1996).

A presença dos fosfolipídios da gema de ovo também evita o aumento de Ca^{++} intracelular durante o resfriamento do sêmen (WHITE, 1993). O Ca^{++} possui importante papel no controle da motilidade espermática (WATSON, 1981), e o aumento na concentração intracelular de Ca^{++} resulta em disfunção e morte celular (WATSON, 1981; AMANN e PICKETT, 1987). É possível que os lipossomas interajam com o cálcio e outros componentes do meio de congelação, afetando a tonicidade ou a fração de água não-congelada durante a criopreservação (WILHELM *et al.*, 1996). Visando minimizar o efeito deletério do Ca^{++} durante o processo de congelação, a partir de 1973 alguns autores passaram a empregar o etileno diaminotetraacetatodissódico (EDTA) em meios diluidores para congelação de sêmen eqüino. Segundo WATSON (1981), a principal função do EDTA é quelar o cálcio no meio extracelular, diminuindo seu influxo para o meio intracelular. Esta ação é extremamente importante durante a faixa de temperatura em que o espermatozóide é mais suscetível ao choque térmico (WATSON, 1981; JASKO *et al.*, 1992).

MARTIN *et al.* (1979) associaram uma substância emulsificante ao diluente de criopreservação, o Orvus-es-paste, que aumenta a disponibilidade e a capacidade protetora dos fosfolipídios. O sêmen congelado com o Orvus-es-paste apresentou motilidade total superior à do diluente sem o agente emulsificador após a descongelação (53,4% x 42,3%), atuando como um importante protetor da membrana acrossomal durante o congelação.

Os açúcares atuam reduzindo a água passível de ser congelada no interior da célula, de modo a diminuir a injúria causada pela cristalização de gelo (AISEN, 2002). Os açúcares são também substratos energéticos para o

espermatozóide durante a incubação; conferem proteção à membrana plasmática durante a congelação e a descongelação, por meio de interações diretas com a membrana, as quais envolvem ligações de hidrogênio dos grupos hidroxil dos açúcares com os grupos fosfatos localizados na cabeça dos fosfolipídeos; e ao restaurarem o percentual de água ao redor dos grupos das cabeças dos fosfolipídios, os açúcares podem prevenir os danos causados pela desidratação extrema (YILDIZ *et al.*, 2000).

Os açúcares como trealose, lactose e manose, por meio do efeito osmótico e das interações específicas com os fosfolipídeos de membrana plasmática, conferem proteção contra o choque térmico (AISEN, 2002). Repondo a água da interface membrana-solução, também demonstra uma interação direta com os grupos polares dos fosfolipídeos durante a desidratação e a congelação, reduzindo as interações de van der Waals entre as cadeias de hidrocarbonetos (AISEN, 2002), estabilizando a membrana plasmática (STOREY *et al.*, 1998). Desta forma, alteraram as propriedades da membrana durante a fase da transição, que ocorre na redução da temperatura (RUDOLPH *et al.*, 1986). Atuam também aumentando a porcentagem de água super-resfriada durante o processo de congelação, reduzindo a concentração de sais nos canais remanescentes e, conseqüentemente, o efeito osmótico (MAZUR, 1984).

O leite vem sendo utilizado na diluição e no armazenamento do sêmen fresco ou resfriado de eqüino. A eficiência das proteínas do leite na criopreservação do sêmen se assemelha ao da gema de ovo, por meio da sua composição protéica, que atua como tampão, e da propriedade quelante diante dos metais pesados, contribuindo para a minimização do choque térmico pelo frio (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Trimeche *et al.* (1990), ao utilizarem um diluente à base de leite, glicose e glicerol na criopreservação de sêmen eqüino, obtiveram um excelente resultado pós-descongelação. Sendo a combinação dos aminoácidos glutamina, prolina, histidina e betaína ao meio INRA82 acrescido de 2,5% de glicerol e 2% de gema de ovo em concentrações diferentes, concluíram que a glutamina e a prolina são mais eficientes do que a histidina e a betaína em aumentar os parâmetros pós-descongelação e que a adição de prolina e

glutamina ao INRA82 proporcionou melhora significativa na motilidade pós-descongelamento do sêmen equino.

2.4.2. Crioprotetores penetrantes

Os crioprotetores penetrantes são classificados em dois grupos: os álcoois (glicerol, etilenoglicol, glicerol etc.) e as amidas, ambos os grupos apresentam características físico-químicas inerentes a um bom agente crioprotetor, que são: baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (MEDEIROS *et al.*, 2002).

O glicerol é o crioprotetor mais utilizado na congelação de sêmen de garanhões (MARTIN *et al.*, 1979; CRISTANELLI *et al.*, 1984; GRAHAM, 1996; VIDAMENT *et al.*, 1997). Os crioprotetores atuam na proteção das estruturas celulares, aumentando o número de canais de solventes que permanecem não-congelados e diluindo as altas concentrações de sais, diminuindo o efeito-solução sobre as células (GRAHAM, 1996), ligando-se fortemente aos íons de hidrogênio na molécula de água, tornando, assim, mais lenta a desidratação celular durante o congelamento (DOEBBLER, 1966). Há evidências de que esse crioprotetor se liga aos fosfolipídios da membrana, diminuindo a sua fluidez e interferindo na sua permeabilidade (PARKS e GRAHAM, 1992), o que reduz o estresse osmótico por meio da reposição de água necessária para manutenção do volume celular, as interações com íons e macromoléculas, assim como o do ponto de congelamento da água (MEDEIROS *et al.*, 2002).

O uso do glicerol na criopreservação do sêmen equino pode estar relacionado à baixa motilidade pós-descongelamento e redução da fertilidade, devido ao efeito tóxico do glicerol. Sua toxicidade parece causar desnaturação das proteínas, alteração nas interações de actina, além de ocasionar mudanças nos eventos citoplasmáticos, devido ao aumento da viscosidade pelo glicerol intracelular, às modificações na polimerização da tubulina, na associação de microtúbulos, à atuação direta na membrana plasmática e às alterações no glicocálix e nas proteínas da superfície celular (ALVARENGA *et al.*, 2000).

A concentração de glicerol ideal para a sobrevivência do espermatozóide é espécie dependente da curva de congelamento e de outros componentes do

diluyente, além do método de envase. A concentração de crioprotetores em bovinos varia entre 7 e 9% nos caprinos e 3 e 4% nos ovinos. Ao fazer uso de pellets obtém-se maior motilidade com o uso de 3 a 4% de glicerol, entre 6 e 8%, em se tratando de ampolas, já as palhetas devem conter de 4 a 6% deste crioprotetor. O sêmen de humanos é congelado com 5 a 10% de glicerol. Em eqüinos ocorre grande variação, sendo necessário o uso de um porcentual inferior ao utilizado para bovinos (KEITH, 1998). De acordo com a maioria dos autores, a concentração de glicerol nos diluidores de congelamento pode variar de 3,5 a 5% (VIDAMENT *et al.*, 1997).

Na congelação de sêmen de garanhão, o etilenoglicol tem sido estudado e comparado com o glicerol. MERCANTE *et al.* (1995) observaram similaridade entre eles para o vigor e a motilidade. ARRUDA (2000) examinou a substituição do glicerol pelo etilenoglicol como crioprotetor de espermatozóides de garanhões, e concluiu que o etilenoglicol e o glicerol têm propriedades crioprotetoras semelhantes.

NEVES NETO *et al.* (1995) compararam as taxas de prenhez de éguas inseminadas com etilenoglicol ou glicerol em meio de congelação à base de Lactose-EDTA-gema, não encontrando diferença estatística.

As amidas são formadas por dois sítios ativos, um grupo amina e um grupo ácido carboxílico. Podem se ligar à água em três sítios, possuindo a metade dos sítios de ligação de hidrogênio com a molécula da água, quando comparada à do glicerol. Porém, as amidas possuem menor viscosidade, o que as torna mais solúveis à água que ao glicerol e mais permeáveis à membrana plasmática, reduzindo os danos celulares por estresse osmótico causado pelos crioprotetores (BALL e VO, 2001).

Uma alta taxa de fertilidade foi alcançada com o uso de acetamida, no congelamento de espermatozóides de coelho (HANADA e NAGASE, 1980). Keith (1998) utilizaram, nos diluidores de sêmen eqüino, agentes crioprotetores penetrantes como a acetamida, metilformamida, formamida, metilformamida e dimetilformamida, e compararam os resultados de motilidade progressiva com o glicerol, e o etilenoglicol. O melhor resultado de motilidade progressiva pós-descongelamento foi do glicerol seguido da metilformamida e dimetilformamida.

VIDAMENT *et al.* (2002) não obtiveram diferença quanto à fertilidade em éguas inseminadas com sêmen pós-descongelamento, em que foram utilizados como crioprotetores o glicerol nas concentrações de 2 e 3% e a dimetilformamida na concentração de 2% (46, 58, 50%, respectivamente).

SQUIRES *et al.* (2004) quando comparou metilformamida, dimetilformamida e etilenoglicol com 0,9M com 0,55M de glicerol, apresentaram resultados similares quanto à motilidade no descongelamento.

2.5. Curva de resfriamento

O principal entrave no sucesso do congelamento do sêmen eqüino está diretamente relacionado à taxa da queda de temperatura que o espermatozóide sofre durante o processo de resfriamento. Uma curva de resfriamento rápido imposta ao sêmen é responsável pela maioria das lesões celulares, em decorrência de alteração da propriedade física das membranas espermáticas (WATSON, 1981). O choque térmico, responsável por mudanças irreversíveis na membrana plasmática do espermatozóide, é mais pronunciado quando o resfriamento ocorre de maneira rápida, sendo a severidade do efeito dependente da curva de resfriamento entre as faixas de 15 a 0 °C (QUINN *et al.*, 1980), 19 a 8 °C (MORAN, 1992; WATSON, 1995; GRAHAM, 1996; FÜRST, 2000).

Douglas-Hamilton *et al.* (1984), comparando taxas de resfriamento rápido (maiores que 1 °C/min), médio (entre 1 e 0,33 °C/min) e lento (menores que 0,33 °C/min), concluíram que as taxas lenta e rápida causam maiores danos (maior número de patologias, menor motilidade e maior número de células mortas após o resfriamento) à célula espermática que a taxa média.

VIDAMENT *et al.* (2000), ao utilizarem o diluidor INRA82, compararam o sêmen resfriado a 4 °C, em 1 hora antes do envase/congelamento, com o sêmen congelado diretamente a partir de 23 °C, e verificaram melhor motilidade espermatozóide para o congelamento após o resfriamento prévio. Estudo com espermatozóide eqüino congelado evidenciou que a queda de -0,8 °C/min entre 24 e 19 °C e a de -0,4°C/min entre 19 e 8 °C podem reduzir as perdas por motilidade espermática durante o congelamento (FÜRST, 2000).

Fürst *et al.* (2005) constataram que a taxa de motilidade total, teste supravital e hiposmótico do sêmen congelado com resfriamento prévio, foi superior ($p < 0,05$) à do protocolo sem resfriamento, tanto no descongelamento a 75 °C/7" quanto a 37 °C/30".

2.6. Curva de congelamento

A curva de congelamento é de extrema importância na manutenção da integridade celular. Quando a taxa é adequada, a célula torna-se progressivamente desidratada e permanece funcional após o descongelamento. Caso contrário, ocorre perda da viabilidade das células, possivelmente em função da diminuição do conteúdo de água intracelular, ocasionando aumento das concentrações de solutos intracelulares e precipitação, com alteração de pH e osmolaridade do meio (WATSON, 1995).

Os danos sofridos pelo espermatozóide durante o congelamento e o descongelamento ocorrem na faixa de temperatura entre -15 e -60 °C (PARKS e GRAHAM, 1992). Entretanto, o tipo de comprometimento celular dependerá da taxa de congelamento. Dessa forma, a desidratação celular será observada quando a taxa de resfriamento oscilar entre 25 a 40 °C/min, enquanto o congelamento lento causa danos à célula, devido a altas concentrações de soluto intracelular durante o processo. Por outro lado, o resfriamento rápido (60 °C/min) pode provocar a recristalização após o descongelamento, com formação de grandes cristais de gelo, o que causa danos físicos à célula (GRAHAM, 1996).

Na criopreservação de sêmen eqüino, a curva de congelamento mais utilizada é a de 60 °C/minuto (curva rápida), obtida quando as palhetas são colocadas em posição horizontal, 3 cm acima do vapor de nitrogênio, durante 20 minutos (MARTIN *et al.*, 1979; AMANN e PICKETT, 1987; JASKO, 1995).

2.7. Curva de descongelamento

O descongelamento é uma das etapas mais importantes no manuseio do sêmen congelado. Diferentes fatores físico-químicos desconhecidos podem influenciar a sobrevivência dos espermatozoides durante o processo de

congelamento e descongelamento. A curva de descongelamento é dependente do tipo de envasamento e do tempo de exposição a uma determinada temperatura (PICKETT e AMANN, 1993).

Quando o congelamento é realizado com curva muito rápida, não há tempo suficiente para que ocorra adequada desidratação, resultando na formação de grandes cristais de gelo no meio intracelular. Para o descongelamento, necessita-se de uma velocidade de descongelamento também rápida, para que não ocorra a recristalização (fusão de cristais de gelo) e, conseqüentemente, lesão celular. Da mesma forma, o congelamento lento exige um descongelamento lento. Neste caso, a desidratação celular é maior e necessita de um tempo maior para que ocorra a re-hidratação espermática, para que a célula não perca a sua viabilidade morfofuncional (MAZUR, 1985).

O descongelamento rápido (75 °C por 7") de sêmen eqüino é mais benéfico ao espermatozóide do que o lento (37 °C por 30") (COCHRAN *et al.*, 1984; SQUIRES *et al.*, 1987), embora possa causar danos irreparáveis ao espermatozóide, quando ultrapassar a temperatura e o tempo de descongelamento (PAPA *et al.*, 1998).

Na avaliação da longevidade do sêmen descongelado, FÜRST *et al.* (2005) observaram que, independentemente do protocolo de descongelamento 75 °C/7" e 37 °C/30", não houve diferença ($P > 0,05$) na motilidade espermática, o mesmo foi constatado por BORG *et al.* (1997). Vidament *et al.* (2001), ao estudarem a motilidade espermática do sêmen descongelado a diversas temperaturas e tempos de descongelamento (37 °C/30", 50 °C/10", 50 °C/20", 60 °C/10", 75 °C/5", 75 °C/10", 75 °C/15"), não observaram diferenças entre os tratamentos, exceto para o descongelamento a 75 °C/15", cuja motilidade foi zero.

2.8. Avaliação do sêmen para criopreservação

Diferentes parâmetros de avaliação do sêmen *in vitro* têm sido desenvolvidos e utilizados ao longo dos anos para determinar a viabilidade espermática de várias espécies (ROTA, 1998). Dentre eles podem ser citados

a motilidade, o vigor, a morfológica espermática, a integridade do acrossoma e da membrana plasmática, a concentração espermática e outros testes mais sofisticados, como: testes com sondas fluorescentes, análises computadorizadas de sêmen, coloração supravital e teste com choque hiposmótico.

2.8.1. Avaliação do sêmen no pré-congelamento

A motilidade e o vigor do sêmen são parâmetros avaliados rotineiramente por estimativa visual subjetiva do número de espermatozóides móveis e de sua intensidade de deslocamento (WOELDERS, 1991). Esses dois critérios foram, por muito tempo, os únicos parâmetros empregados na avaliação da integridade dos espermatozóides (DOBRINSKI *et al.*, 1993). No entanto, a porcentagem de espermatozóides móveis pode não estar completamente correlacionada com a fertilidade do sêmen (GRAHAM *et al.*, 1996), o que pode ser devido à forma subjetiva com que a motilidade e o vigor têm sido analisados (JASKO *et al.*, 1991), ou pela variação individual observada entre garanhões (AMANN e PICKETT, 1987), ou, ainda, pela variabilidade entre ejaculados de um mesmo reprodutor (AMANN e PICKETT, 1987; DOUGLAS-HAMILTON *et al.*, 1987; MULLER, 1987).

No Brasil, os critérios da avaliação do sêmen eqüino e caprino seguem os padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Assim, para a aprovação do sêmen a fresco são convencionados padrões de motilidade na ordem de 70%, vigor 3 (0-5), e de 70% de espermatozóides com morfologia normal.

A concentração e a avaliação da morfologia espermática são também parâmetros utilizados para classificar a qualidade fertilizante do sêmen de garanhões. Segundo Bielanki *et al.* (1982), o exame morfológico das células espermáticas é o melhor método para predizer a fertilidade de um garanhão, embora exija uma classificação objetiva e criteriosa. Desde que o procedimento da criopreservação pode alterar drasticamente a qualidade espermática, tem sido preconizado que antes do congelamento o sêmen deve apresentar morfologia normal maior que 70% (MULLER, 1987). Entretanto, Samper e Morris (1996) consideram que amostras com percentuais de 40 a 50% de

espermatozóides anormais são possíveis de congelamento, porém Arns *et al.* (1987) sugerem a utilização de sêmen eqüino de baixa qualidade, desde que mantido um número mínimo de espermatozóides viáveis.

2.8.2. Avaliação do sêmen descongelado

Os critérios mínimos estabelecidos para o uso de sêmen descongelado na IA têm sido preconizado como sendo 35% de motilidade total imediatamente após o descongelamento (CRISTANELLI *et al.*, 1984; LOVE *et al.*, 1989). Uma avaliação do padrão adotado para motilidade espermática pós-descongelamento em 19 centros especializados em congelamento de sêmen eqüino mostrou oscilações de 30 a 40% (dez centros), 35% (oito centros) e 40% (um centro) (SAMPER e MORRIS, 1996). Entretanto, vale ressaltar mais uma vez que só a avaliação da motilidade espermática não prediz de forma adequada a real capacidade de fertilização do sêmen (GRAHAM *et al.*, 1996). No Brasil, o CBRA (1998) preconiza como parâmetro para condenação da partida de sêmen congelado valores inferiores a 30% para a motilidade total, vigor menor que 3 e acima de 40% de espermatozóides com defeitos totais.

2.8.3. Avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozóides

Em virtude de os parâmetros convencionais das características seminais mostrarem baixa, ou nenhuma, correlação com a fertilidade, técnicas alternativas têm sido desenvolvidas, objetivando predizer melhor a capacidade fertilizante do sêmen nas diferentes espécies (JEYENDRAN *et al.*, 1984; SMITH e MURRY, 1997; VAZQUEZ, 1997; MELLO, 1999). Estes testes são utilizados, então, para avaliar a capacidade fecundante do espermatozóide, visando avaliar três características fundamentais da célula espermática: atividade metabólica para produção de energia; enzimas localizadas no acrossoma, essenciais para penetração no ovócito; e proteínas presentes na membrana plasmática, importantes para a sobrevivência do espermatozóide no trato reprodutivo da fêmea e na adesão à membrana plasmática do ovócito no momento da fertilização (AMANN e PICKETT, 1987).

Dentre os testes que visam prever com maior acurácia a capacidade fertilizante do gameta masculino, podem ser citadas as técnicas que utilizam corantes específicos, microscopia eletrônica ou avaliação do comportamento do sêmen diante das soluções hiposmóticas, dentre outros.

2.8.3.1. Coloração supravital

As colorações supravitais, também conhecidas como coloração de vivos e mortos, geralmente consistem na utilização de corantes derivados da fluoresceína, em combinação ou não com outros corantes de fundo. A ação desses corantes depende da integridade das membranas, de modo a impedir ou não a sua penetração no compartimento nuclear do espermatozóide (GARNER *et al.*, 1986). Essa coloração avalia diretamente a integridade estrutural da membrana plasmática da cabeça do espermatozóide.

Smith e Murry (1997) avaliaram diferentes técnicas de coloração para determinar a integridade da membrana plasmática do sêmen fresco e descongelado de bovinos e ovino. De acordo com os autores, a técnica que utiliza eosina-nigrosina apresentou como principais vantagens a rapidez e a facilidade em sua execução.

Melo (1999), utilizando a técnica de coloração de eosina-nigrosina em sêmen eqüino resfriado com diferentes meios diluidores, obteve taxas que variaram de 73,0 a 82,6 espermatozóides vivos. De acordo com o autor, a porcentagem de espermatozóides vivos foi superior quando o meio diluente apresentava gema de ovo em sua constituição. No mesmo estudo encontrou-se alto índice de correlação ($r = 0,75$; $P < 0,05$) entre a porcentagem de vivos e a motilidade total e progressiva. Entretanto, vale ressaltar que esses parâmetros avaliam características celulares diferentes. Desta forma, pode-se detectar perda de motilidade espermática sem ocorrer concomitantemente perda da integridade da membrana plasmática da cabeça do espermatozóide (MELO, 1999; FÜRST *et al.*, 2005).

2.8.3.2. Teste hiposmótico

O teste hiposmótico (Host) é o método utilizado para avaliar a integridade funcional da membrana da célula espermática em várias espécies: humana (JEYENDRAN *et al.*, 1984), caprina (FONSECA *et al.*, 2001), canina (KUMI-DIAKA 1993), suína (VAZQUEZ, 1997) e eqüina (VIDAMENT *et al.*, 1998; MELO, 1999; NEILD *et al.*, 1999). Este teste baseia-se na capacidade do espermatozóide reagir quando exposto a soluções hiposmóticas. Nessas condições ocorre o influxo de água para o interior da célula, para que se estabeleça o equilíbrio osmótico entre os meios extra e intracelular, provocando o aumento de volume na célula e posterior dobramento da cauda (JEYENDRAN *et al.*, 1992).

A reatividade da membrana espermática ao meio hiposmótico está relacionada com a presença de um mecanismo iônico ativo na membrana celular, provavelmente envolvendo o sistema de bomba de Na^+/K^+ (DARNNELL *et al.*, 1986). Caiza *et al.* (1997), utilizando a oubain, inibidor específico da bomba de Na^+/K^+ -ATPase dependente, potencializaram a reação hiposmótica, caracterizada pelo resultado final com dobramento da cauda. Estudos têm demonstrado que a integridade da membrana plasmática do flagelo é fundamental para a atividade mitocondrial (VIDAMENT *et al.*, 1998).

Neild *et al.* (1999), objetivando padronizar o Host, testaram diferentes soluções solutas e concentrações osmóticas para avaliar o sêmen eqüino a fresco e pós-descongelamento. Os resultados obtidos indicaram que as soluções hiposmóticas constituídas de frutose, sacarose ou lactose nas osmolaridades de 25, 50 e 100 mOsm/kg apresentaram os melhores resultados, ou seja, maior porcentagem de dobramentos, quando comparadas ao meio com citrato de sódio.

Melo (1999), com o intuito de determinar o teste hiposmótico ideal para a espécie eqüina, verificou que, independentemente do soluto, as soluções com 150 mOsmol/kg ou menos demonstraram melhores respostas ao teste hiposmótico. Na espécie eqüina, a porcentagem de caudas dobradas após a incubação hiposmótica em meio de 150 mOsmol/kg diminuiu após o congelamento e descongelamento da amostra. von Buiten *et al.* (1992) obtiveram 65% de reação hiposmótica com sêmen fresco e apenas 45% de

caudas dobradas após o descongelamento. Segundo Vidament *et al.* (1998), o teste hiposmótico parece ser, até o momento, a melhor avaliação para predizer a capacidade do sêmen eqüino de suportar o processo de congelamento.

2.8.3.3. Teste de termorresistência (TTR)

A motilidade e o vigor espermáticos são parâmetros analisados durante o TTR, no tempo zero. Vários fatores influenciam os resultados do TTR, dentre eles: efeito do ejaculado (PINTO *et al.*, 1978), método de congelamento (PICKETT *et al.*, 1961) e efeitos do tempo de incubação (JONDET, 1980). A resposta do espermatozóide ao tempo de incubação das amostras é considerada a variável mais importante para o sêmen eqüino. As avaliações no TTR são realizadas em períodos que variam de 90 (COCHRAN *et al.*, 1984), 180 (MATTOS *et al.*, 1993) e 240 minutos (CBRA, 1998).

2.9. Dose inseminante, local de deposição e fertilidade do sêmen congelado

A finalidade da utilização de sêmen congelado eqüino é a obtenção de taxas de fertilidade semelhantes à monta natural, porém ainda são necessários o aperfeiçoamento e a padronização de técnica de criopreservação para maximizar esta tecnologia. Dentre alguns fatores podem ser destacados: momento da inseminação, local de deposição do sêmen, dose inseminante, qualidade e padronização do sêmen congelado.

Amann e Pickett (1987) sugeriram que o processo de congelamento/descongelamento, além de danos à motilidade espermática progressiva, também afeta o metabolismo espermático, a integridade de membrana celular, o conteúdo das enzimas acrossomais e a interação oócito-espermatozoides, e causam danos às núcleo-proteínas. Os autores registraram baixa taxa de fertilidade *in vitro*, quando da utilização do sêmen congelado, mesmo quando as doses inseminantes tenham concentração adequada de espermatozoides com motilidade progressiva.

Leipold *et al.* (1998), estudando a influência no aumento na concentração espermática por dose inseminante de 320 milhões para 800 milhões de espermatozoides, com motilidade progressiva pós-

descongelamento, constataram que poderiam aumentar as taxas de concepção. As taxas de concepção no primeiro estro foram de 27 e 31%, sendo recomendada a utilização da concentração de 320-400 milhões de espermatozóides com motilidade progressiva, podendo-se utilizar apenas uma palheta de 0,5 mL com concentração espermática de 1,6 bilhão de espermatozóides no pré-congelamento.

Nos Estados Unidos utilizam-se quatro palhetas francesas de 0,5 mL na inseminação com sêmen congelado de garanhão com motilidade progressiva de 40% no descongelamento e na concentração final de 320 milhões de espermatozóides móveis por dose inseminante pós-descongelamento (SQUIRES *et al.*, 1999).

As concentrações espermáticas ideais para obtenção da máxima eficiência reprodutiva, em garanhão, divergem entre os pesquisadores, possivelmente em decorrência de diferentes protocolos utilizados, como o uso de diferentes diluidores, o momento de inseminação, a qualidade seminal, dentre outros. Os critérios mínimos estabelecidos para o uso de sêmen descongelado na IA têm sido preconizados como sendo de 35% de motilidade total imediatamente após o descongelamento (CRISTANELLI *et al.*, 1984; LOVE *et al.*, 1989). Entretanto, Magistrini (1992) descartou partidas de sêmen com 35% de motilidade progressiva pós-descongelamento. Uma avaliação do padrão adotado para motilidade espermática pós-descongelamento, em 19 centros especializados em congelamento de sêmen eqüino, mostrou oscilações de 30 a 40% (dez centros), 35% (oito centros) e 40% (um centro) (SAMPER e MORRIS, 1996).

A forma de inseminação vem demonstrando ser uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva em programas comerciais de inseminação artificial com sêmen congelado, podendo ser por meio do método convencional, depositando de 200 a 500 milhões de espermatozóide viáveis no corpo do útero (MORRIS *et al.*, 2000), ou pela deposição do sêmen ipsilateral à ovulação próxima à junção útero tubárica, por meio de pipeta flexível guiada através da cérvix e corno uterino (FLEURY e CASSOLI, 1999).

Técnicas como a esteroscopia na inseminação artificial em eqüinos vêm sendo empregadas com êxito como alternativa no uso racional de sêmen de garanhões subférteis ou com baixa congelabilidade (MORRIS *et al.*, 2000).

Uma das grandes vantagens desse método parece ser a utilização de reduzido número de espermatozoides por dose inseminante (até 5×10^6 espermatozoides). Essa técnica consiste no uso de um endoscópio, que auxilia na deposição do sêmen na papila útero-tubária ipsilateral ao folículo ovulatório (MORRIS *et al.*, 2000; ALVARENGA *et al.*, 2002; LINDSEY *et al.*, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esta tese de doutorado é o resultado de três experimentos, desenvolvidos no Setor de Eqüideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa, região da Zona da Mata no Estado de Minas Gerais, situado a 20°45'20" latitude S, 42°52'40" W Gr longitude e altitude média de 752 m; no IZ Instituto de Zootecnia de Colina, situado no município de Colina-SP, a 20°43'05" latitude, 48°32'38" longitude e altitude média de 588 m; e no Haras EAO da Fazenda Baviera, localizado no município de Itagibá-BA, a 14°17'11" latitude, 39°50'34" longitude e altitude média de 185 m entre os meses de outubro a março, nas estações reprodutivas de 2003/2004 e 2004/2005, com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento/descongelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen de eqüinos.

Experimento 1: Efeito de diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação do sêmen eqüino.

Experimento 2: Efeito da concentração espermática na fertilidade do sêmen eqüino congelado.

Experimento 3: Efeito de duas taxas de congelamento sobre a fertilidade do sêmen eqüino criopreservado.

3.1. Experimento 1 – Efeito de diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação do sêmen eqüino

3.1.1. Material e métodos

O experimento foi realizado no Haras EAO da Fazenda Baviera, localizado no município de Itagibá-BA, situado a 14°17'11" latitude, 39°50'34" longitude e altitude média de 185 m, no período de outubro a março, nas estação reprodutivas de 2003/2004.

3.1.1.1. Animais experimentais

Foram utilizados cinco ejaculados de três garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade média entre 5 e 10 anos. Antes do início do período experimental, os animais foram submetidos a exame andrológico.

Todos os animais foram mantidos em baias individuais, recebendo dieta constituída de capim-cameron (*Pennisetum purpureum*) picado, sal mineral e água *ad libitum*, com suplementação de concentrado para suprir as necessidades de manutenção de acordo com NRC (1989). Os animais foram soltos em piquetes de capim-estrela (*Cynodon dactylon*), diariamente por um período de 4 horas.

Antes do período experimental, os animais foram submetidos a duas coletas diárias, durante oito dias consecutivos, com a finalidade de esgotar as reservas extragonadais. Posteriormente, foram colhidos dois ejaculados semanais, com intervalo de três dias de cada garanhão, durante três semanas, perfazendo um total de cinco coletas por animal. As coletas de sêmen foram realizadas, empregando-se o método de vagina artificial (modelo Hannover), devidamente preparada e com temperatura interna entre 44 e 45 °C. Éguas em estro natural foram utilizadas como manequim.

3.1.1.2. Avaliação do sêmen pré-congelamento

Para avaliação da motilidade progressiva (Mot) e do vigor (escala de 0 a 5), uma alíquota de 10 µL de sêmen foi depositada em lâminas de vidro previamente aquecidas e avaliadas em microscópio óptico, com aumento de 200 vezes.

A concentração espermática foi determinada com o uso de câmara de Neubauer, sendo o número de espermatozóides expresso em mL (KRAUSE, 1966). Após a coleta o sêmen foi diluído na proporção de 10 µL de sêmen em 1 mL de solução de formol-salino tamponada (HANCOCK, 1957). Para determinação da concentração final pós-centrifugação, o sêmen diluído com meio congelador foi rediluído em solução de formol-salino, quando se realizou novo cálculo.

Para avaliação da morfologia espermática utilizou-se uma alíquota de 10 µL de sêmen e 1 mL de formol-salino, que foi depositada em lâmina de vidro recoberta com lamínula, mantida à temperatura de 37 °C, sendo então examinada em microscopia óptica de contraste de fase no aumento de 1.000 vezes, onde foram contadas 200 células para determinação do percentual de espermatozóides normais e anormais. As anormalidades espermáticas foram classificadas segundo CBRA (1998).

3.1.1.3. Testes complementares

Teste hiposmótico

Na solução de 100 mOsmol à base de sacarose (1 mL) foram adicionados 10 µL de sêmen, sendo, em seguida, a amostra incubada por 50 minutos em banho-maria, a 37 °C. Após esse período, alíquotas do sêmen diluído foram colocadas entre a lâmina e a lamínula, para a contagem de 100 células de cada solução em microscopia de contraste de fase com aumento de 400 x.

As células foram classificadas quanto à presença ou não da cauda enrolada, segundo os padrões descritos por KUMI-DIAKA (1993). O cálculo da reação hiposmótica foi feito por meio da fórmula Host = (% de alteração na

região da cauda após o Host) - (% de alterações na região da cauda antes do teste Host) (MELO e HENRY, 1997).

Coloração supravital (eosina-nigrosina)

A coloração supravital (eosina-nigrosina) foi realizada imediatamente após o esfregão (5 minutos), segundo Barth e Oko (1989). De acordo com esta técnica, os espermatozóides classificados como vivos não se coraram pela eosina, e os mortos apresentam os núcleos vermelhos. Foram contadas 200 células espermáticas de cada amostra sob microscopia óptica comum, no aumento de 400 x.

3.1.1.4. Centrifugação

Após a coleta o sêmen, o meio centrifugador e o meio congelador (MARTIN *et al.*, 1979) foram mantidos em banho-maria, a 37 °C. Após a coleta e a avaliação do sêmen foi feita a diluição com meio centrifugador na proporção de 1:1 e, então, centrifugados a 650 x g, por 10 minutos. Durante a centrifugação o meio congelador foi retirado do banho-maria e mantido à temperatura ambiente de 23 a 26 °C.

Após a centrifugação e a retirada do plasma seminal, os *pellets* foram ressuspendidos com meio congelador (MARTIN *et al.*, 1979). Em seguida, foram retiradas alíquotas para os exames complementares. O volume do meio congelador foi acrescentado até a obtenção da concentração total de 200 milhões de espermatozóide por mL. O envase do sêmen foi realizado em intervalo máximo de 15 minutos após a centrifugação, em palhetas de polietileno de 0,5 mL, previamente identificadas de acordo com o garanhão, a partida e o tipo de tratamento.

Composição do meio centrifugador glicose EDTA

Reagentes	Quantidade
D (+) glicose monohidratada	6,000 g
Citrato de sódio	0,375 g
EDTA (etileno diaminotetraacetatodissódico)	0,370 g
Bicarbonato de sódio	0,125 g
Penicilina G (sódica ou potássica)	100,000 UI
Sulfato de estreptomicina	0,100 g
pH	6,59
mOsm/L	409

Fonte: Martin *et al.* (1979).

Diluyente de congelamento

Reagentes	Quantidade
Solução de lactose a 11%	50,0 mL
Diluyente de centrifugação	25,0 mL
Gema de ovo	20,0 mL
Orvus-es-paste	0,8 mL
Glicerol	5,0 mL

Fonte: Martin *et al.* (1979).

3.1.1.5. Resfriamento do sêmen

O resfriamento do sêmen eqüino foi realizado com base no protocolo proposto por Fürst *et al.* (2005), onde as palhetas com o sêmen diluído em meio congelador foram colocadas em um tubo de ensaio de 20 mL, em temperatura ambiente. Em seguida, o tubo de ensaio revestido por um refil (saco plástico) foi colocado dentro de um recipiente de plástico (mamadeira) de aproximadamente 240 mL contendo 120 mL de álcool absoluto. O recipiente foi então colocado na posição horizontal dentro de uma geladeira de 280 L, com temperatura interna de 4-5 °C, com taxa média de -0,5 °C, por um tempo de resfriamento 35 minutos. Apenas o tempo de equilíbrio dos tratamentos foi alterado.

Tratamento 1: tempo de equilíbrio de 25 minutos.

Tratamento 2: tempo de equilíbrio de 85 minutos.

Tratamento 3: tempo de equilíbrio de 145 minutos.

3.1.1.6. Congelamento

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas do T1, T2 e T3 sobre um suporte de aço inoxidável previamente colocado 4 cm acima do nitrogênio líquido, acondicionado em uma caixa de isopor com 40 cm de comprimento x 32 cm de altura x 20 cm de largura, contendo 5 cm de nitrogênio no seu interior, durante 15 minutos. Após esse período as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio, para congelação final do sêmen. Em seguida, foram colocadas em raques, devidamente identificadas e armazenadas em botijão com nitrogênio, para análises posteriores.

3.1.1.7. Descongelamento

O sêmen foi descongelado em banho-maria, a 37°C.

3.1.1.8. Avaliação do sêmen descongelado

Teste de termorresistência

A longevidade dos espermatozóides congelados/descongelados foi avaliada por meio do teste de termorresistência (TTR). Após o descongelamento, o sêmen foi incubado em banho-maria a 37 °C, por 90 minutos. A avaliação de motilidade e vigor espermático foi feita nos tempos 0, 20, 40, 60 e 90 minutos. Ainda no tempo 0, foram retiradas alíquotas de 10 µL de sêmen, para avaliação da porcentagem de vivos e espermatozóides reativos ao Host.

3.1.1.9. Análises estatísticas

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o programa SAEG (UFV, 1997).

Os dados de motilidade, vigor, patologia, Host e vivos e mortos foram avaliados pela análise de variância e a média foi comparada pelo teste SNK, o 5%.

3.1.1.10. Resultados e discussão

As características físico-morfológicas espermáticas, como motilidade progressiva, vigor e patologia, e a porcentagem de espermatozóides mortos pelo teste supravital realizados no sêmen fresco estão na Tabela 1. Os valores médios aproximam-se dos padrões de normalidade considerados para a espécie (JASKO, 1992; CBRA, 1998).

Tabela 1 – Características do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador (média \pm EPM)

	Garanhões		
	1	2	3
Volume (mL)	37 \pm 19,2 AB	21 \pm 5,5 B	52 \pm 8,4 A
Concentração x10 ⁶	28,8 \pm 19,8 B	60,6 \pm 3,7 A	34 \pm 14,8 B
Motilidade progressiva	67 \pm 6,7	65 \pm 8,7	71 \pm 7,4
Vigor (0-5)	4,2 \pm 0,4	4,5 \pm 0,35	4,3 \pm 0,3
Características morfológicas do sêmen fresco dos garanhões testados			
Defeitos maiores	7,6 \pm 2,5	14,6 \pm 5,4	9,5 \pm 3,0
Defeitos menores	3,5 \pm 1,5	3,6 \pm 0,5	3,0 \pm 2,0
Porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (Host)			
Host	39,6 \pm 5,85 B	29,6 \pm 12,34 B	52,8 \pm 11,2 A
% de espermatozóides corados (mortos) no sêmen fresco pelo teste eosina-nigrosina			
Mortos	12,8 \pm 4,76 B	36,2 \pm 12,13 A	10,4 \pm 3,36 B

(P < 0,05).

A porcentagem de espermatozóides reativos ao Host, com membrana íntegra e funcional, foi em média de 40,66%. Estes resultados aproximam-se dos reportados de Neild *et al.* (1999) (Tabela 2).

Tabela 2 – Tempo transcorrido entre a colheita e os procedimentos laboratoriais durante o congelamento do sêmen

Curvas	Tempos (minutos)		Total
	Coleta e Centrifugação	Resfriamento	
T1	23,45	60	71,8
T2	23,45	120	131,8
T3	23,45	240	191,8

O processo de criopreservação ocasiona redução na viabilidade da célula espermática. No entanto, a metodologia aplicada neste experimento foi capaz de minimizar as lesões ocasionadas nesse processo, atribuídas: ao efeito da mudança de temperatura sobre a resposta celular, à formação de cristais de gelo intracelular; aos danos oxidativos, às alterações na permeabilidade da membrana do espermatozóide, à toxicidade do crioprotetores e ao estresse osmótico (WATSON, 2000).

A motilidade espermática progressiva total avaliada no TTR, nos tempos de 0, 20 e 40 minutos, não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Figura 1). Não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos quanto à motilidade espermática progressiva total, avaliada nos diferentes tempos do TTR, e o vigor avaliado dentro de cada tempo (Figura 2).

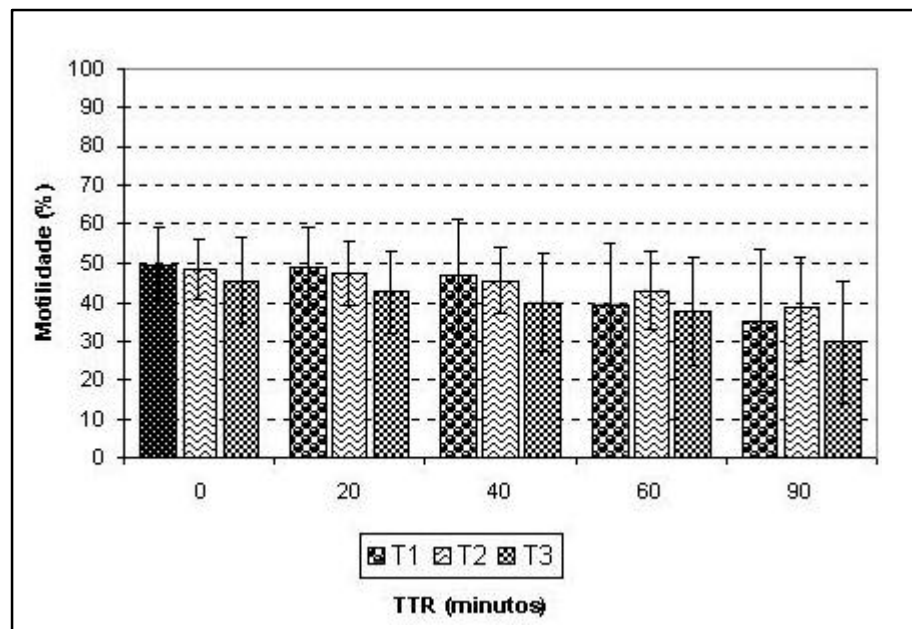


Figura 1 – Motilidade espermática progressiva total do sêmen descongelado dos três tratamentos (T1, T2 e T3), nos diferentes tempos do teste de termorresistência (TTR). (T1 = tempo de equilíbrio de 25 minutos, T2 = tempo de equilíbrio de 85 minutos e T3 = tempo de equilíbrio de 145 minutos) ($P > 0,05$).

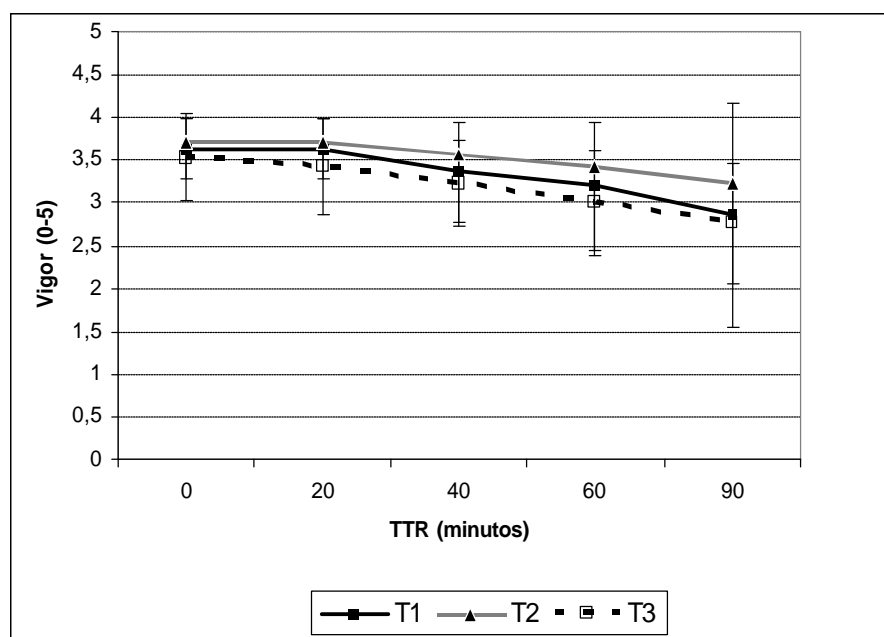


Figura 2 – Vigor espermático do sêmen descongelado em diferentes tempos de equilíbrio (T1, T2 e T3), dentro de cada tempo do TTR. (T1 = tempo de equilíbrio de 25 minutos, T2 = tempo de equilíbrio de 85 minutos e T3 = tempo de equilíbrio de 145 minutos) ($P > 0,05$).

Os valores para motilidade progressiva encontrados neste estudo estão acima daqueles encontrados na literatura para a espécie (COCHRAN *et al.*, 1984; CRISTANELLI *et al.*, 1984; VIDAMENT *et al.*, 1997; PAPA *et al.*, 2001). Durante todo o TTR houve perda de 29,04% (67,66% vs 49,33%) na motilidade, quando comparado com o sêmen fresco. Zúccari (1998) encontrou valores médios para motilidade progressiva aos 90 minutos de TTR de 20%, valores estes inferiores aos encontrados neste experimento, que foi de 34%.

Casey *et al.* (1993) verificaram para o sêmen eqüino a fresco alta correlação entre as células viáveis e a função mitocondrial. A motilidade é um processo que requer elevada demanda de energia, apresentando correlação positiva com as concentrações de ATP (JANUSKAUSKAS e RODRIGUES-MARTINEZ, 1995). Por essa razão, o nível de ATP é um importante indicador de seu potencial metabólico, cuja síntese está associada à capacidade funcional das mitocôndrias.

Nas condições deste experimento, o tempo de equilíbrio não influenciou na criopreservação do sêmen eqüino, uma vez que não houve diferença

($P > 0,05$) entre todos os tratamentos, em todos os parâmetros analisados (motilidade e vigor no TTR).

Na temperatura ambiente, os lipídeos e as proteínas de membrana permanecem em um estado de fluidez, no entanto a contínua queda de temperatura, durante o processo de resfriamento, promove alterações físicas da membrana, que passa do seu estado líquido-cristalino ao de gel. As cadeias de ácidos graxos estavam aleatoriamente distribuídas e ordenaram-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida e tornando essas áreas fracas e suscetíveis a rupturas, fusões e permeáveis a íons (HAMMERSTEDT *et al.*, 1990).

A zona de choque térmico (19 e 8 °C) é a faixa de temperatura em que a membrana plasmática do espermatozóide apresenta-se mais sensível à queda de temperatura, ocasionando alterações irreversíveis à estrutura e função da membrana (MORAN, 1992; WATSON, 1995; GRAHAM, 1996). No entanto, poucos são os estudos que avaliam o efeito da manutenção da célula 5 °C, chamado tempo de equilíbrio, sobre a fertilidade seminal pós-descongelamento.

Nesse período as proteínas da membrana são afetadas pelo resfriamento, como redução da atividade enzimática quando o espermatozóide é resfriado de 37 para 10 °C. A taxa relativa de atividade da adenilciclase sofreu redução de 90% e a atividade da fosfodiesterase decaiu de modo similar (HAMMERSTEDT e HAY, 1980). O mesmo acontece no transporte de substância através da membrana plasmática, que também apresentou queda da atividade a baixas temperaturas.

Surge, assim, a hipótese de que membrana plasmática de espermatozóide eqüino é tolerante à desidratação rápida a 22 °C, quando a se encontra na fase de gel, e talvez seja mais sensível a lesões.

Cochran *et al.* (1984) observaram mobilidades espermáticas semelhantes na adição do glicerol em duas temperaturas (22 e 4 °C). Noiles *et al.* (1992), em trabalhos preliminares, observaram que espermatozóide de garanhão era caracterizado pela extraordinária permeabilidade à água e ao glicerol, a 22 °C. Sieme *et al.* (1998) sugeriram que os efeitos deletérios da osmolaridade mudam em integridade de membrana e estão menos pronunciados entre 22 e 4 °C.

A integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide foi avaliada por meio do teste hiposmótico (Host). Este teste tem como objetivo avaliar a capacidade do espermatozóide de reagir em um meio hipotônico, quando este possui membrana plasmática funcionalmente ativa (CORREA e ZAVOS, 1994).

Os resultados dos testes hiposmóticos e a porcentagem de supravital logo após o descongelamento, em função dos tratamentos, estão representados na Figura 3. Houve queda de cerca de 33% no número de espermatozóides reativos ao Host no descongelamento, em comparação aos resultados encontrados no sêmen fresco (Tabela 1). A porcentagem média de espermatozóides reativos ao Host no descongelamento variou de 31,13 a 21,93%, sendo superior ao encontrado na literatura para o sêmen eqüino.

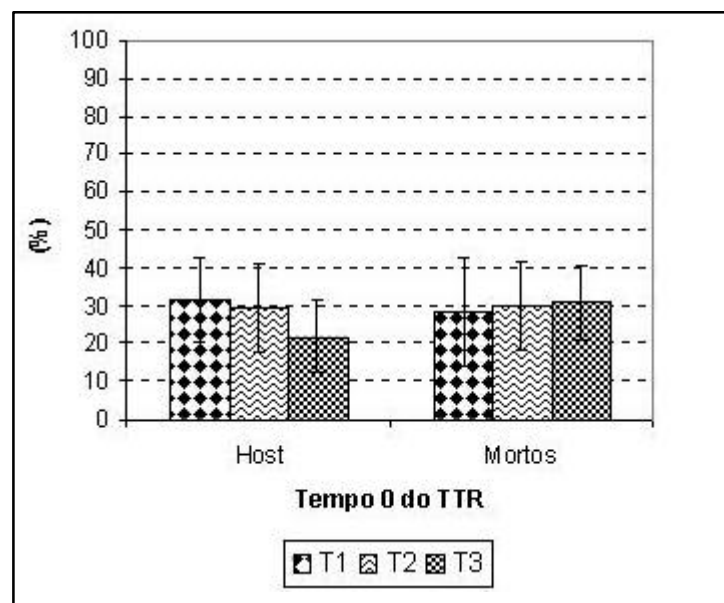


Figura 3 – Porcentagem de espermatozóides mortos (corados) e Host no teste supravital no tempo 0 do TTR, submetidos a três diferentes tempos de equilíbrio (T1, T2 e T3) ($P > 0,05$).

A integridade estrutural das membranas plasmáticas avaliadas pelo teste supravital não diferiu entre os tratamentos, sendo o valor dos espermatozóides mortos de aproximadamente 36,15%; resultados semelhantes foram encontrados por Fürst *et al.* (2005).

O acrossoma é uma organela que pode ser prejudicada pelo processo de congelamento (WATSON, 1981; GARNER *et al.*, 1999), entretanto não foi observado aumento do número de anomalias de acrossoma após o descongelamento, pela microscopia de contraste de fase (Tabela 3). Estes valores diferem dos observados por Brisko (2000), que registrou aumento das patologias de acrossoma após o descongelamento, avaliado em microscopia de contraste de fase, mostrando que a técnica de congelamento utilizada neste estudo, independentemente do tempo de equilíbrio, não afetou o percentual de anomalia espermática.

Tabela 3 – Valores médios e desvio-padrão das patologias das amostras espermáticas em cada tempo de equilíbrio

	Fresco	T1	T2	T3
Acrossoma	4,6 ± 3,35	7,2 ± 3,4	8,14 ± 3,7	9,51 ± 7
Gota protoplasmática P	1,13 ± 2,14	0	0	0
Cauda fort. Dobrada	4,93 ± 3,95	2,86 ± 2,5	3,3 ± 3	3,33 ± 2,8
Peça intermediária	2,133 ± 2,82	1,46 ± 1,8	0,66 ± 1,7	0,6 ± 1,3
Cabeça estreita base	1,74 ± 1,75	0	0	0
Cabeça isolada normal	0,4 ± 0,54	0	0	0

(P > 0,05).

3.1.1.11. Conclusão

O uso de tempos de equilíbrio muito longos não melhora a resposta do sêmen eqüino ao processo de criopreservação, avaliados pela motilidade progressiva total, pelo vigor espermático, pelas características morfológicas e pelos testes de termorresistência e Host.

3.2. Experimento 2 – Efeito da dose inseminante na fertilidade do sêmen eqüino criopreservado

3.2.1. Material e métodos

3.2.1.1. Localização

O experimento foi realizado em três locais distintos. No Instituto de Zootecnia de Colina, situado no município de Colina-SP, localizado a 20°43'05" de latitude, 48°32'38" de longitude e altitude média de 588 m, onde foram feitas as coletas, as avaliações e os congelamentos do sêmen dos garanhões da raça Bretã; no Setor de Eqüideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa, região da Zona da Mata, no Estado de Minas Gerais, situado a 20°45'20" de latitude S, 42°52'40" W Gr de longitude e altitude média de 752 m, onde foi feito o teste de fertilidade das éguas Bretãs; e no Haras EAO da Fazenda Baviera, localizado no município de Itagibá-BA, situado a 14°17'11" de latitude, 39°50'34" de longitude e altitude média de 185 m, onde foram realizadas a coleta, a avaliação e o congelamento do sêmen dos garanhões da raça Mangarlarga Marchador e o teste de fertilidade das éguas Mangarlarga Marchador, no período de outubro a março, nas estações reprodutivas de 2003/2004 e 2004/2005.

3.2.1.2. Animais experimentais

Foram utilizados seis garanhões da raça Mangalarga Marchador e dois da raça Bretão-Postier, com histórico de fertilidade conhecido, com idades que variavam de 5 a 10 anos. Antes do início do período experimental, os animais foram submetidos a exame andrológico.

O resfriamento do sêmen eqüino foi realizado com base no protocolo proposto por Fürst *et al.* (2005), em que as palhetas com o sêmen diluído em meio congelador foram colocadas em um tubo de ensaio de 20 mL, em temperatura ambiente. Em seguida, o tubo de ensaio revestido por um refil

(saco plástico) foi colocado dentro de um recipiente de plástico (mamadeira) de aproximadamente 240 mL, contendo 120 mL de álcool absoluto. O recipiente foi então colocado na posição horizontal dentro de uma geladeira de 280 L, com temperatura interna de 4-5 °C, com taxa média de -0,5 °C, por um tempo de resfriamento de 35 minutos, com tempo de equilíbrio de 25 minutos.

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas sobre um suporte de aço inoxidável, previamente colocado a 4 cm acima do nitrogênio líquido, acondicionado em uma caixa de isopor com 40 cm comprimento x 32 cm de altura x 20 cm de largura, contendo 5 cm de nitrogênio no seu interior, durante 15 minutos. Após esse período as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio, para a congelação final do sêmen. Em seguida foram colocadas em raques, devidamente identificadas, e armazenadas em botijão com nitrogênio, para análises posteriores.

Todas as éguas utilizadas no programa de inseminação apresentavam boa condição corporal e foram mantidas em regime de pasto, água e sal mineral *ad libitum*.

Foram utilizados 95 ciclos de éguas com idade entre 3 e 15 anos, sendo 30 ciclos de éguas mestiças da raça Bretão-Postier com 3 a 15 anos de idade e peso vivo entre 350 e 600 kg, as quais foram inseminadas com sêmen congelado de Bretão, e 64 ciclos de éguas solteiras e paridas da raça Mangalarga Marchador com 3 entre 12 anos de idade e peso vivo entre 300 e 350 kg, inseminadas com sêmen congelado de garanhões da raça Mangarlarga Marchador.

3.2.1.3. Controle da ovulação e inseminações

As inseminações das éguas Mangalarga Marchador foram distribuídas conforme o programa de acasalamento da propriedade, utilizando-se o garanhão adequado no Haras EAO, no município de Itagiba-BA. A inseminação das éguas Bretãs foi distribuída de forma aleatória, no Setor de Eqüinocultura da UFV. Todas as inseminações foram feitas com doses inseminantes alternadas.

Os animais foram rufiados diariamente e as éguas em cio foram submetidas à palpação retal diária, até a detecção de um folículo de 45 mm

diâmetro. A partir desse diâmetro as palpações foram realizadas a cada 6 horas, até a detecção da ovulação, quando foram inseminadas.

As éguas a serem inseminadas foram conduzidas ao tronco de contenção e seu preparo consistia em bandagem e suspensão da cauda, retiradas das fezes da ampola retal e anti-sepsia da região do períneo com água e sabão neutro. As inseminações foram realizadas, depositando-se o sêmen na extremidade do corno ipsilateral à ovulação, com o auxílio de uma pipeta flexível, da marca Minitub, de 75 cm (Figura 4).

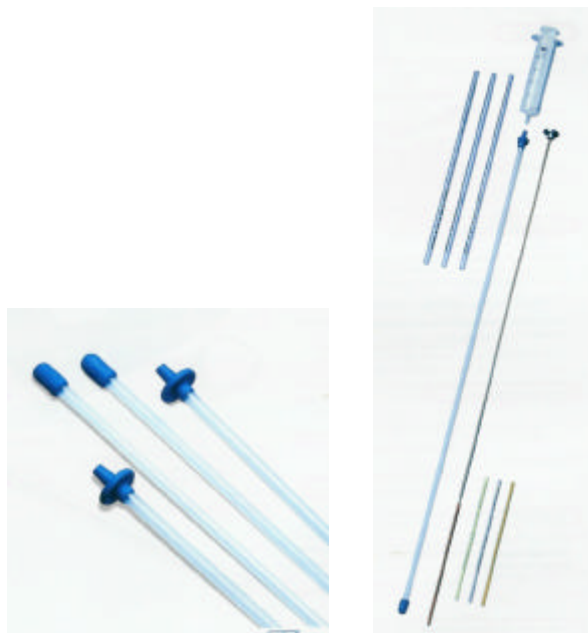


Figura 4 – Pipeta de inseminação marca Minitub 75 cm.

3.2.1.4. Concentração da dose inseminante e diagnóstico de gestação

Foram utilizadas duas concentrações inseminantes. A primeira com 300 milhões de espermatozóides viáveis (T1) e a segunda com 150 milhões de espermatozóides viáveis (T2). Para o cálculo do número de palhetas a serem utilizadas em cada inseminação, utilizou-se como parâmetro a motilidade progressiva das partidas do sêmen no descongelamento, em que este era armazenado em tubo de ensaio graduado, sendo ajustado o volume com a motilidade, para obtenção da dose desejada.

Foram realizadas palpação retal aos 20 dias pós-ovulação e ultra-som, modelo Piemedical 480, com uma sonda de 5 MHz, ao 30^o dia pós-ovulação

3.2.1.5. Análises estatísticas

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o programa SAEG (UFV, 1997).

Os dados de motilidade, vigor, patologia, Host e vivos e mortos foram avaliados pela análise de variância, e a média foi comparada pelo teste SNK, a 5%.

Para análise da fertilidade foi utilizado o teste qui-quadrado, a 5%.

3.2.1.6. Resultados e discussão

As características seminais de volume, motilidade progressiva, vigor e concentração e a porcentagem de espermatozóides vivos pelo teste supravital do sêmen de oito garanhões das raças Mangalarga Marchador (MM) e Bretão-Postier (BP) estão na Tabela 4. Constatou-se que elas se encontram dentro dos padrões de normalidade da raça e de acordo com as normas exigidas pelo CBRA (1998), para que o sêmen possa ser submetido ao processo de criopreservação. No entanto, a média dos animais da raça Bretã apresentaram maior porcentagem de patologias morfológicas e menor porcentagem de espermatozóides normais do que os animais da raça MM.

Tabela 4 – Características do sêmen fresco de cinco ejaculados de oito garanhões das raças Mangalarga Marchador e Bretão-Postier (média ± EPM)

	Garanhões							
	MM 1	MM 2	MM 3	MM 4	MM 5	MM 6	B 1	B 2
Volume (mL)	52,5±14,8	45,6±13,7	51,2±20	28±7,4	29±7,4	31,6±11,5	53,75±19,22	63,3±15,91
Concentração (10x6)	85±37,8 ^A	88,4±45,2 ^{AB}	60±27,4 ^{AB}	172±64,6 ^{AB}	121±92,7 ^B	30,4±16,8 ^B	106±55,68	201±148,65
Motilidade progressiva	70,8±8 ^A	70±6,1 ^{AB}	60±6,1 ^{AB}	72±8,4 ^{AB}	68±6,7 ^B	66±6,7 ^B	58,12±11	66,5±9,44
Vigor (0-5)	3,75±0,8	4±0,5	4,3±0,4	4,1±0,42	3,9±0,55	3,8±0,8	3±0,26	3,4±0,4
Características morfológicas do sêmen fresco dos garanhões testados								
Defeitos maiores	7,5±4,4	4,6±4,0	11,6±5,0	14,4±7,6	5,0±4,0	6,7±7,2	22,2±11,0	13,3±15,2
Defeitos menores	4,7±5,5	2,4±3,0	3,0±3,5	4,5±5,0	2,5±4,5	4,5±5,0	1,2±0,82	1,5±0,7
SPZ normais	87,8	93	85,2	81	92,6	89,15	76,7	73,1
Porcentagem de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (Host)								
Host	47,16±8,2 ^A	54±3,3 ^B	69±8,5 ^{BC}	43,6±7,8 ^{BC}	58,2±10,2 ^C	43,2,8± ^C	43,87±7,7	46,3±12,4
Porcentagem de espermatozoides corados (mortos) no sêmen fresco pelo teste eosina-nigrosina								
Mortos	12,8±4	15,8±4	25,8±21,5	23,6±10,8	12,4±6,7	7,8±0,8	1,16±1,16	1,4±1,0

Letras distintas em cada linha indicam valores diferentes (P < 0,05).

A porcentagem média de espermatozóides reativos ao Host foi de 52,3 e 45,1 % para os animais das raças MM e BP, respectivamente (Tabela 4). Os animais BP tiveram menor integridade funcional da membrana plasmática da cauda dos espermatozóides e maior porcentagem de patologias morfológicas de cauda (GPP) no início do experimento.

O efeito conjunto do estresse osmótico e da temperatura causa desestabilização da membrana durante processo de congelamento, tanto pela exposição à redução de temperatura, como pela exposição às concentrações elevadas de sais (HOLT, 2000). A redução foi: na motilidade média do sêmen fresco para o descongelado (68 vs 44,6%) e (62,74 vs 48,21%), na porcentagem de células reativas ao Host (52,3 vs 28,22%) e (45,08 vs 33,15%), para os animais das raças MM e BP, respectivamente; e o aumento foi na porcentagem de células mortas avaliadas pela coloração supravital (16,2 vs 34,55%) e (19,02 vs 18,75%).

Na avaliação da longevidade do sêmen descongelado a cada 20 minutos, durante 90 minutos, foram registrados a porcentagem de espermatozóides móveis e o vigor. Observou-se queda na motilidade espermática ao longo do TTR. A queda da motilidade espermática do sêmen descongelado foi gradativa e lenta (Figura 5). O declínio da motilidade pode ser explicado pelas mudanças no transporte ativo e na permeabilidade da membrana plasmática, da região da cauda do espermatozóide. No entanto, é possível que uma alteração na energia disponível ou os danos causados a elementos do axonema possam contribuir para esse declínio na motilidade, podendo resultar em baixa motilidade, sem um alto índice de lesão à membrana plasmática (WATSON, 1995).

Brisko (2000) classificou os ganhões, de acordo com sua congelabilidade, em: excelentes, bons, regulares e ruins. Excelentes são ganhões que possuem motilidade progressiva no pós-descongelamento; excelentes >50%, bons 49% = X = 39%, regulares 35% = X = 25% e ruins <25%. Seguindo esta classificação, dois ganhões se enquadraram na classificação excelente (1 Bretão e Marchador) e seis bons (1 Bretão e 5 Marchador). Segundo Vidament *et al.* (1997), a qualidade do sêmen fresco tem sido apontada como um dos pré-requisitos para o sucesso na criopreservação do sêmen eqüino, corroborando com os resultados deste estudo, havendo uma

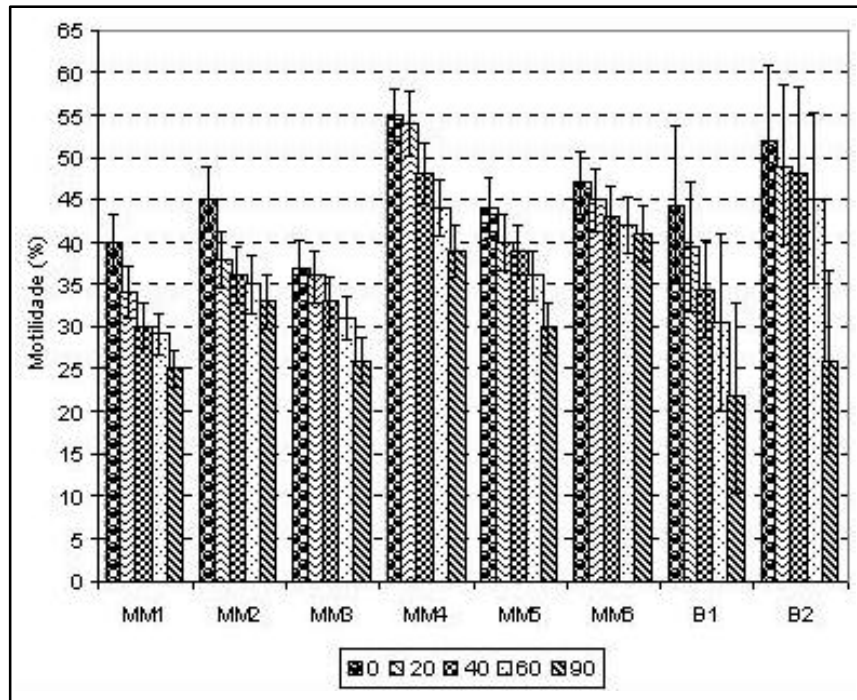


Figura 5 – Porcentagem da motilidade do sêmen congelado de cada ganhão da raça Mangalarga Marchador e Bretão, nos diferentes tempos do teste de termorresistência (TTR).

similaridade na resposta ao congelamento entre ganhões, apesar das diferenças raciais, expressas pelas respostas de motilidade progressiva, vigor, Host e espermatozoides mortos mostrados pelo supravital, durante o tempo 0 do TTR (Figuras 5, 6 e 7). O mesmo não foi encontrado por Samper (1992) e Cottorello (2002).

Em geral, os estudos evidenciam queda na motilidade pós-descongelamento, por fatores como: taxas de resfriamento, congelamento e aquecimento, meios de congelamento, métodos de centrifugação (AMANN e PICKETT, 1987). Os valores da motilidade e do vigor espermáticos pós-descongelamento mostrados nas Figuras 5 e 6 foram superiores aos valores obtidos por Cochram *et al.* (1984) e Papa *et al.* (2001). Aparentemente, a curva de resfriamento proposta por FÜRST (2005) mostrou-se mais eficiente na preservação da integridade estrutural e funcional da membrana plasmática, promovendo maior proteção à membrana contra o choque térmico pelo frio do que as curvas utilizadas nesses experimentos. Moran (1992), Watson (1995) e Graham (1996) afirmaram que o choque térmico pelo frio é mais pronunciado quando o resfriamento ocorre de maneira rápida, na faixa de temperatura entre

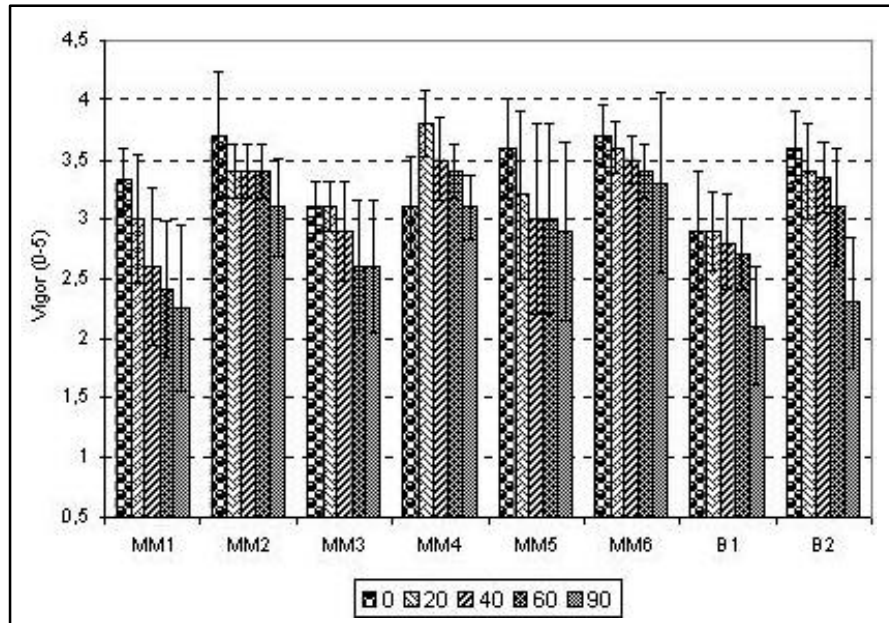


Figura 6 – Diferença no vigor do sêmen congelado de cada garanhão da raça Mangalarga Marchador e Bretão, em cada tempo do TTR.

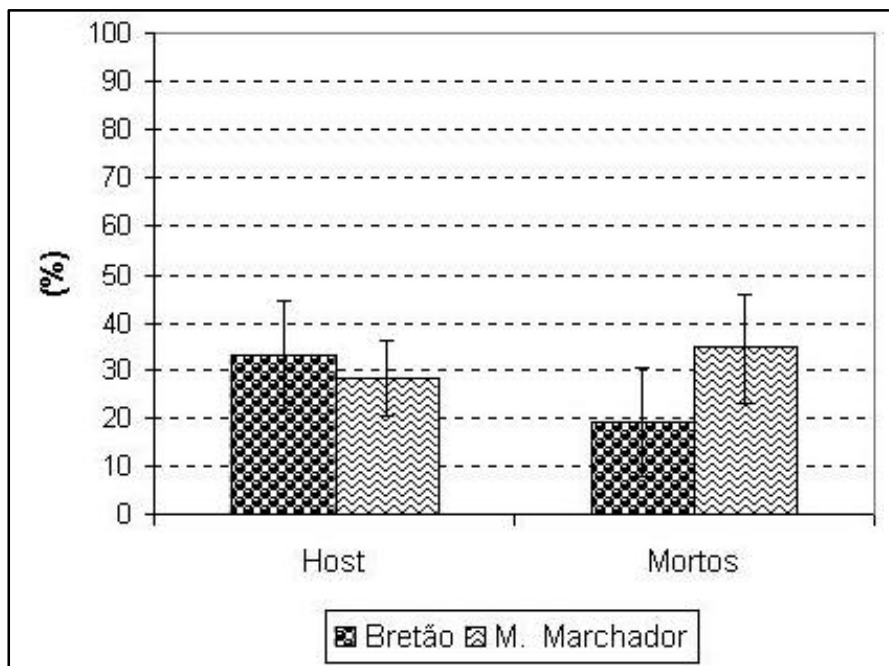


Figura 7 – Porcentagem média de espermatozóides mortos (corados) nos testes supravital e Host dos garanhões da raça Bretã e Mangalarga Marchador, sêmen descongelado no tempo 0 do TTR ($P > 0,05$).

19 e 8 °C, em que a severidade do efeito é dependente da curva de resfriamento, ocasionando mudanças irreversíveis à membrana plasmática do espermatozóide, tornando-a incapaz de realizar suas atividades metabólicas e provocando ruptura e perdas de componentes celulares.

O efeito da concentração espermática por dose inseminante sobre a taxa de concepção de éguas inseminadas com sêmen congelado de garanhões de diferentes raças está na Tabela 5. Um total de 95 ciclos foi analisado (T1 = 64 ciclos e T2 = 31 ciclos). Não houve diferença ($P > 0,05$) entre tratamentos (T1 = 54,69 vs T2 = 51,66) quanto à taxa de concepção das éguas inseminadas.

Tabela 5 – Efeito da concentração espermática por dose inseminante sobre a taxa de fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado no primeiro ciclo

Raça	T1 = 300 x 10 ⁶		T2 = 150 x 10 ⁶	
	Número IA	Gestante	Número IA	Gestante
Mangarlarga Marchador	49	25	16	11
Bretão	15	10	15	5
Nº de ciclos	64	35	31	16
Total (%)		54,68%		51,61%

O uso do sêmen congelado eqüino visa maximizar o número de éguas cobertas por garanhão em determinada estação do ano. A concentração de espermatozoides viáveis por dose inseminante é um dos fatores de maior importância nos programas de IA com sêmen congelado, já que pode otimizar o uso de garanhão. Pesquisadores estudam a concentração mínima ideal para o sêmen congelado eqüino (LEIPOLD *et al.*, 1998; Squires *et al.*, 1999). Pace e Sullivan (1975), comparando concentrações de 160, 80 e 40 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva, não encontraram diferença entre os valores de 80 e 160 milhões. No entanto, PAPA *et al.* (1989) obtiveram redução na fertilidade quando a concentração da dose inseminante foi reduzida de 400 para 200 milhões de espermatozoides viáveis.

Cristanelli *et al.* (1984) obtiveram 56% de prenhez, utilizando uma palheta de 0,5 mL com concentração de 350×10^6 , enquanto Dell'Aqua (2000), utilizando dose de 50×10^6 pré e pós-ovulação, obtiveram 50% (5/10) de prenhez. Samper *et al.* (1994), usando 1.000×10^6 de espermatozóides, alcançaram 72% de prenhez.

A forma de inseminação vem demonstrando ser uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva em programas comerciais de inseminação artificial com sêmen congelado, podendo ser por meio do método convencional, depositando de 200 a 500 milhões de espermatozóides viáveis no corpo do útero (MORRIS *et al.*, 2000), ou pela deposição do sêmen ipsilateral à ovulação, próxima à junção útero-tubárica, por meio de pipeta flexível guiada através da cérvix e do corno uterino (FLEURY e CASSOLI, 1999).

A inseminação artificial com o sêmen congelado consiste no método de análise *in vivo*, que define o verdadeiro potencial de fertilidade dos espermatozóides. A taxa de prenhez neste experimento corrobora com resultados preliminares obtidos para o sêmen descongelado, independentemente da raça utilizada. Estes resultados foram superiores aos encontrados na literatura para o sêmen eqüino (ALVARENGA *et al.*, 2001; SQUIRES *et al.*, 2002).

Aparentemente, a curva de resfriamento proposta por Fürst (2005) mostrou ser eficiente na preservação da integridade funcional da membrana plasmática, provavelmente por promover maior proteção contra o choque térmico pelo frio. Além do mais, não houve diferença quando se comparou 150×10^6 com 300×10^6 , obtendo resultados satisfatórios em ambos os tratamentos.

3.2.1.7. Conclusão

A inseminação artificial com diferentes doses inseminantes de 150 e 300 milhões de espermatozóides apresentou resultados satisfatórios, quando comparados com os da literatura. Pode-se afirmar que, com o intuito de maximizar a técnica de inseminação com sêmen congelado, a dose com concentração espermática menor seria adequada para eqüino.

3.3. Experimento 3 – Efeito de duas taxas de congelamento e dois protocolos de descongelamento sobre o sêmen eqüino criopreservado

3.3.1. Material e métodos

3.3.1.1. Local e período do experimento

O experimento foi realizado no Haras EAO da Fazenda Baviera, localizado no município de Itajibá, Estado da Bahia, no período de outubro a novembro, na estação reprodutiva de 2004/2005.

3.3.1.2. Animais experimentais

Foram utilizados cinco ejaculados de cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade média entre 5 e 10 anos. Antes do início do período experimental os animais foram submetidos a criterioso exame andrológico.

3.3.1.3. Processamento do sêmen

Após a coleta, tanto os ejaculados do sêmen *in natura* como do sêmen descongelado foram processados conforme descrito no Experimento 1.

3.3.1.4. Curvas de congelamento

Antes do resfriamento as palhetas foram identificadas quanto ao número da partida, nome do garanhão e tratamento utilizado. Depois foram submetidas a duas curvas de congelamento.

Para o congelamento foram utilizados dois protocolos distintos: no primeiro (T1) foi utilizada a curva de congelamento horizontal (CH), que foi feito em vapor de nitrogênio líquido, colocando-se as palhetas sobre um suporte de aço inoxidável, a 4 cm acima da lâmina do nitrogênio líquido, acondicionado em uma caixa de isopor com 40 cm comprimento x 32 cm de altura x 20 cm de

largura, contendo 5 cm de nitrogênio no seu interior, e pré-congeladas durante 20 minutos no vapor de nitrogênio. Posteriormente, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio e, em seguida, armazenadas em botijão, para análises posteriores.

No segundo tratamento (T2) e curva de congelamento vertical (CV), o congelamento do sêmen foi realizado com o uso de um suporte metálico de aço inoxidável com capacidade de 46 palhetas. A altura do suporte metálico no botijão de sêmen foi determinada quando da observação do som característico do contato da base do suporte na superfície do nitrogênio líquido; nessa posição as palhetas ficavam a 5 cm do nitrogênio líquido, durante 20 minutos. Após esse período o suporte metálico foi imerso no nitrogênio líquido, para a congelação final do sêmen, sendo, em seguida, colocadas em raques, devidamente identificadas, e armazenadas em botijão com nitrogênio, para análises posteriores.

A queda da temperatura foi medida previamente, utilizando termômetro digital (+199 °C e -200 °C). Para isso, o sensor do termômetro foi introduzido na base, no meio e no topo da galeria, por um período de 20 minutos; a mesma mensuração foi repetida três vezes, e então tirou-se a média de cada ponto.

3.3.1.5. Descongelamento

O sêmen foi descongelado em banho-maria, utilizando-se também dois protocolos: protocolo 1, descongelamento em banho-maria a 75 °C, por 7 segundos, e mantido a 37 °C, por 30 segundos; e protocolo 2, descongelamento em banho-maria a 37 °C, por 30 segundos.

3.3.1.6. Análises estatísticas

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o programa SAEG (UFV, 1997).

Os dados de motilidade, vigor, patologia, Host e vivos e mortos foram avaliados pela análise de variância e a média comparada pelo teste SNK, a 5%.



Dimensões do aparato

A = haste 30 cm

B = mandril de regulagem 20 cm

C = aparato para congelamento vertical

D = haste com as paletas

E = botijão de congelamento

Figura 8 – Suporte metálico utilizado no congelamento vertical.

3.3.1.7. Resultados e discussão

As características do sêmen *in natura* utilizados no presente estudo estão na Tabela 6. Os valores médios estão dentro dos padrões de normalidade considerados para a espécie (JASKO, 1992; CBRA, 1998). Entretanto, deve-se ressaltar que a seleção dos garanhões para o experimento não utilizou as características seminais como fator determinante, por não ser o objetivo deste experimento avaliar a congelabilidade dos respectivos garanhões, mas sim os danos sofridos pelos espermatozóides durante cada fase do pré-congelamento e após o descongelamento do sêmen.

Tabela 6 – Características seminais, morfológicas e espermatozóides relativas ao Host e à coloração de vivos/mortos do sêmen fresco de cinco ejaculados de cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador (média \pm EPM)

	Garanhão				
	1	2	3	4	5
Volume (mL)	40 \pm 14,4 a	46 \pm 16,7ab	33,3 \pm 24,2b	42 \pm 8,4b	19 \pm 7,4b
Concentração ($\times 10^6$)	58 \pm 21,7 ^a	32 \pm 13b	31,7 \pm 16 b	46 \pm 8,2b	79,6 \pm 28b
Motilidade progressiva (%)	81 \pm 5,5	70 \pm 5	65 \pm 7,7	69 \pm 5,5	67 \pm 9,7
Vigor (0-5)	4,2 \pm 0,4	3,2 \pm 0,3	3,1 \pm 0,25	3,7 \pm 0,6	3,9 \pm 1
Características morfológicas do sêmen fresco dos garanhões testados					
Defeitos maiores	8 \pm 9	5,8 \pm 5,3	3 \pm 2	9 \pm 8	9 \pm 6,7
Defeitos menores	5,8 \pm 4,8	4,6 \pm 4,4	2,8 \pm 1,2	8,8 \pm 6	3,2 \pm 1,7
Porcentagem de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (Host)					
Host	64,4 \pm 8,3	55,2 \pm 11,2	57,5 \pm 13	53,4 \pm 7,6	48,8 \pm 3,56
Porcentagem de espermatozóides corados (mortos)					
Mortos	11,6 \pm 7,3a	15,4 \pm 7,3b	16,7 \pm 6,9 b	17,2 \pm 4, b	27,8 \pm 6

Letras distintas em cada linha indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

As reações hiposmóticas do sêmen fresco submetido à solução de sacarose estão apresentadas na Tabela 6, cujos valores médios aproximam-se dos representados por Neild *et al.* (1999). Quanto à correlação entre motilidade espermática progressiva e Host, constatou-se baixa correlação 0,22 ($p < 0,005$).

Nas Tabelas 7 e 8 estão a longevidade (motilidade espermática progressiva e o vigor espermático) dos espermatozóides descongelados a cada 20 minutos, durante 90 minutos, respectivamente. Independentemente do procedimento do congelamento e descongelamento, observou-se queda na motilidade e no vigor espermático ao longo do TTR, sendo essa gradativa e lenta para todos os tratamentos, não diferindo ($p < 0,05$) entre os tempos do TTR.

Tabela 7 – Porcentagem da motilidade espermática nos diferentes tempos do TTR, quando submetida a duas curvas de congelamento e a dois protocolos de descongelamento

	Descong.	TTR (minutos)				
		0	20	40	60	90
Curva	37 °C	50,2±10,6a	42,4±12 b	39,8±15 b	36,7±12,6	26±13 b
Horizontal	75 °C	55±7,39 a	45,87±9,4a	40,2±9,4 b	36,3±12,7	25,5±2 b
Curva	37 °C	55±6,18 a	51,14±9,2a	50,2±10,4a	43,64±9,4	35,9±10 a
Vertical	75 °C	56±7,14 a	52,8±8,8 a	50±9,2 a	43,9±14,2	40,86±1 a

Letras distintas em cada coluna indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

Tabela 8 – Vigor do sêmen descongelado nos diferentes tempos do TTR, quando submetidos a duas curvas de congelamento e a dois protocolos de descongelamento

	Descong.	TTR (minutos)				
		0	20	40	60	90
Curva	37 °C	3,34±0,5 b	3,1±0,45	2,8±0,5 b	2,65±0,6 b	2,4±0,6 b
Horizontal	75 °C	3,5±0,5 ab	3±0,5	2,8±0,6 b	2,65±0,6 b	2,2±0,7 b
Curva	37 °C	3,5±0,4 ab	3,2±0,55	3,4±1,4 a	3±0,45 a	2,65±0,5 a
Vertical	75 °C	3,7±0,3 a	3,4±0,4	3±0,45 a	3±0,6 a	2,65±0,5 a

Letras distintas em cada coluna indicam valores diferentes ($P < 0,05$).

Ambos os procedimentos, de congelamento e descongelamento, mostraram ser eficientes na manutenção da integridade funcional da membrana plasmática. Comparando-se a porcentagem de espermatozóides móveis pós-descongelamento com o sêmen fresco (Tabela 6), observaram-se

perdas de motilidade espermática progressiva total próximas aos 28,6% no T0 do TTR, ao final do TTR (90 minutos), devendo ser ressaltado que este valor não ultrapassou aos 50%, independentemente do procedimento de congelamento e descongelamento. Esses resultados são superiores ao encontrado por ZÚCCARI (1998). Entretanto, verifica-se queda acentuada na motilidade espermática progressiva total pós-descongelamento para CH, quando comparada aos primeiros 20 minutos do TTR com a CV (42,4 vs 51,14% e 45,8 vs 52,8%), no descongelamento a 37 e 75 °C, respectivamente ($P < 0,05$). Quando avaliados os tempos 40 e 90, observou-se superioridade para motilidade progressiva e vigor para CV, nos diferentes tempos de descongelamento ($P < 0,05$) (Tabelas 7 e 8).

A taxa de descongelação é um dos fatores limitantes para o sucesso da criopreservação. Se a taxa de resfriamento for rápida, a taxa de descongelação também deverá ser rápida; do mesmo modo, para um resfriamento lento, a descongelação deverá ser feita a uma taxa equivalente (AMANN e PICKETT, 1987). Mazur (1977) e Seidel (1986) afirmam que há possibilidade de ocorrer lesão causada pelo descongelamento rápido, por não haver tempo suficiente para que o excesso de crioprotetor se difunda para o meio externo. À medida que o meio extracelular se descongela ocorre a lise da célula, em razão do rápido influxo de água, sendo o estresse osmótico o fator final que influenciará a sobrevivência ou os danos aos espermatozóides.

Neste estudo não houve diferença entre os protocolos de descongelamento pela avaliação do vigor espermático durante TTR, independentemente da curva de congelamento empregada (Tabela 9). Estes valores não concordam com os de outros estudos (SQUIERES *et al.*, 1987; JASKO *et al.*, 1994; BORG *et al.*, 1997), que obtiveram maior motilidade pós-descongelamento nas amostras submetidas às altas temperaturas 75 °C/7 segundos. Contudo, os autores ressaltam que a manutenção das amostras por tempos superiores aos recomendados resulta em graves lesões espermáticas. Fürst (2002) obteve aumento no vigor espermático, embora a alta temperatura no descongelamento não tenha contribuído para o aumento da motilidade espermática progressiva.

A taxa de congelamento ótima varia de acordo com o tipo de célula e é considerada, assim, quando se minimiza o tempo de exposição das células às

altas concentrações de eletrólitos (PICKETT, 1986). Quando os espermatozóides são resfriados a uma taxa moderada (20 a 40 °C/min), a água intracelular não-congelada difunde para o meio extracelular, devido ao aumento da concentração de soluto na fração de água extracelular não-congelada, promovendo a desidratação da célula. Desta forma, não há formação de cristais de gelo intracelular. Este procedimento, contudo, resulta em uma concentração de soluto intracelular, o qual pode ser deletério para o gameta. Se por outro lado os espermatozóides são resfriados muito rápidos (>60 °C/min), a água intracelular não dispõe de tempo hábil para se difundir para o meio extracelular antes que ela comece a se congelar, o que resulta na formação intracelular de cristais de gelo. A formação inicial de gelo intracelular pode causar danos, no entanto as lesões mais severas ocorrem quando há a recristalização no interior da célula. Estando a célula abaixo da zona crítica de resfriamento (-15 a -60 °C), os espermatozóides se encontram inertes e podem ser mergulhados no nitrogênio líquido para estocagem, amenizando os danos causados pelo efeito solução, uma vez que o metabolismo espermático é reduzido (GRAHAM, 1999).

A extensão do dano celular causado pela elevada concentração de soluto estará na dependência de três fatores: concentração de eletrólitos, tempo de permanência dos espermatozóides em solução hipersaturada de eletrólitos e da temperatura. O aumento na concentração de eletrólitos precisa ocorrer antes que todo sistema se solidifique entre -79 e -196 °C, pois a temperatura muito baixa não lesará a célula, desde que a concentração normal não tenha sido excedida entre 0 e -79 °C (FARRANT, 1965).

A curva de congelamento ideal tem como intuito amenizar os efeitos da recristalização, assim como o efeito-solução, reduzindo as perdas celulares durante o congelamento.

A curva horizontal imprime uma queda de -70 °C/min, que possivelmente reduz o efeito solução, mas não evita o efeito de recristalização, que ocorre entre -100 e -130 °C/min. Em relação à curva vertical, à medida que o aparato é introduzido no botijão de sêmen, ocorre queda média de temperatura de 5 a -100 °C/min (Figura 9). Acredita-se que nesse momento haja cristalização, assemelhando-se ao *seeding*, fazendo com ocorra redução nos efeitos deletérios causados na recristalização, ou mesmo efeito solução durante o

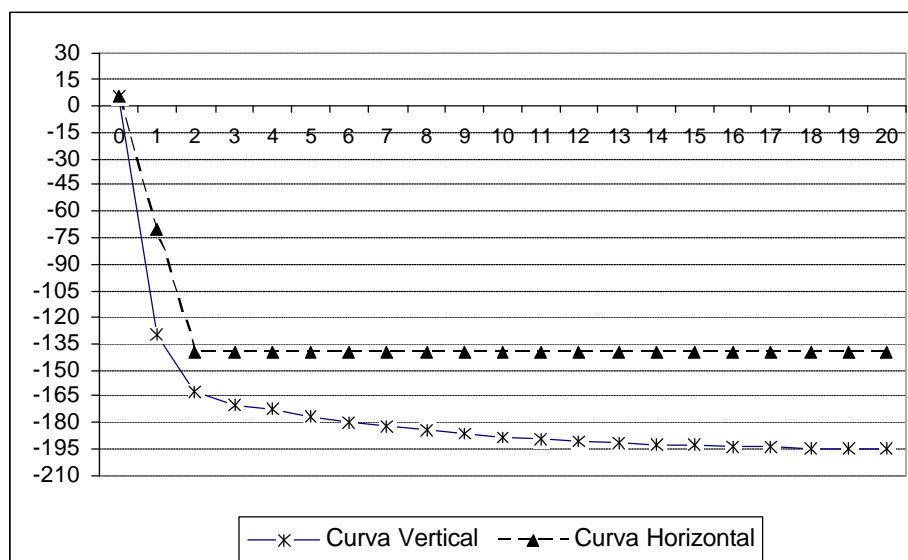


Figura 9 – Taxas de congelamento impostas ao sêmen.

superesfriamento. Abaixo do ponto eutético de uma solução, ou seja, mesmo no estado sólido, reações podem ocorrer e a recristalização é um dos maiores exemplos. Pequenos cristais de gelo convexos possuem energia de superfície muito mais alta do que os cristais planos, e a tendência natural é diminuir essa energia por meio da fusão entre si, processo denominado de recristalização. A recristalização pode ocorrer a temperaturas tão baixas quanto -100 e -130 °C, tanto para água pura como em géis e soluções aquosas concentradas, e sua taxa de ocorrência depende do tamanho do cristal durante o resfriamento e da temperatura subsequente à qual são expostas (MAZUR, 1985).

A Tabela 9 representa o efeito duas curvas de congelamento (CH e CV) e dois diferentes protocolos de descongelamento nas características funcionais e estruturais dos espermatozóides de eqüino, após os descongelamentos avaliados no Host e supravital. Com base nos resultados obtidos, verificou-se que a reação ao Host, assim como o supravital, não diferiu ($P > 0,05$) entre as duas curvas de congelamento, assim como no sêmen fresco, no T0 do TTR, o que sugere a manutenção da integridade funcional e estrutural da membrana plasmática em todos os tratamentos. Para o sêmen congelado foi verificada baixa correlação entre motilidade espermática progressiva com Host e supravital, com coeficientes de 0,2 e 0,48 ($p = 0,16$ e $p = 0,005$, respectivamente).

Tabela 9 – Porcentagem de espermatozóides mortos (corados) no teste supravital e Host submetidos a duas diferentes curvas de congelamento (CH e CV) e dois protocolos de descongelamento (37 e 75 °C)

	Descongelamento	Host	Mortos
Curva horizontal	37 °C	33,82±5,85	18,22±7,3
	75 °C	39,26±12,34	16,8±6,9
Curva vertical	37 °C	40,9±11,16	14±5,8
	75 °C	42,35±13,6	14,6±4,1

(P > 0,05).

O declínio da motilidade progressiva total pode ser explicado pelas mudanças no transporte ativo e na permeabilidade da membrana plasmática da região da cauda dos espermatozóides. É possível que a alteração na energia disponível ou danos aos elementos do axonema possam contribuir para este declínio, podendo ser esperados resultados de baixa motilidade espermática progressiva, sem encontrar alto índice de lesão na membrana plasmática (WATSON, 1995).

Não houve diferença (P > 0,05) entre as duas taxas de congelamento estudadas quanto às características morfológicas do sêmen fresco e descongeladas (Tabela 10). O acrossoma é uma organela que pode ser lesado durante o processo de congelamento (WATSON, 1981; GARNER *et al.*, 1999). No entanto, neste estudo, não foi observado aumento do número de patologias de acrossoma após o descongelamento, pelo microscópio de contraste de fase. Esse resultado difere dos registrados por BRINSK *et al.* (2000), devido ao reduzido número de anormalidades acrossomais encontrado neste experimento, após os diferentes protocolos de congelamento.

Tabela 10 – Morfologia espermática em sêmen *in natura* e sêmen eqüino criopreservado da raça Mangalarga Marchador, em dois protocolos de congelamento

Patologias	Acrossoma	Cab. Fort. Dob.	P.I.	Cab. Est. Base
Sêmen fresco	4,6±3,35	4,93±3,95	2,133±2,82	1,74±1,75
Curva horizontal	6,6±3,68	2,26±2,6	1,71±1,83	0,65±0,24
Curva vertical	5,17±3,3	2,2±2,2	1,82±1,62	0,44±0,2

Tabela 11 – Efeito da concentração sobre a taxa de fertilidade de éguas inseminadas com sêmen congelado na curva vertical

	300 Milhões		150 Milhões	
	Número IA	Gestante	Número IA	Gestante
Nº de ciclos	11	9	14	10
Total (%)		81,80%		71,40%

As taxas de prenhez representadas sofreram influência ($P > 0,05$) das duas concentrações espermáticas, assim como a técnica de congelamento utilizada. Torna-se difícil comparar dados obtidos neste experimento com os verificados na literatura, devido às diferenças metodológicas utilizadas. É preciso considerar a forma de resfriamento, o congelamento, o modo e o momento de inseminação, além de outras variáveis, como congelabilidade e raça dos garanhões. Além de a metodologia utilizada diferir, a maioria dos trabalhos consultados avalia apenas a motilidade espermática progressiva total do sêmen descongelado, não sendo mencionados outros parâmetros como motilidade do sêmen inicial, forma de inseminação e protocolo de congelamento.

Nas concentrações espermáticas ideais para a obtenção da máxima eficiência reprodutiva em eqüinos não têm obtida uma regularidade entre os diferentes pesquisadores, possivelmente em decorrência da divergência de procedimentos experimentais, como o uso de diferentes protocolos de resfriamentos, diluidores, local de deposição do sêmen, individualidade do garanhão e momento da inseminação com sêmen congelado.

O índice de prenhez, na curva de congelamento vertical, foi considerado satisfatório no presente estudo. É importante ressaltar que o tamanho da amostra utilizada neste experimento foi baixo, não refletindo a verdadeira realidade deste protocolo. Não foi possível comparar os tratamentos, uma vez que o número de animais inseminados foi insatisfatório.

Essa taxa de fertilidade pode ser explicada pelo comportamento do sêmen durante o TTR, momento da inseminação, assim com local de deposição do sêmen, podendo ser próximo aos resultados com a inseminação com sêmen fresco diluído. Existe correlação positiva entre o TTR e a motilidade

espermática progressiva. Garner *et al.* (1986) relataram coeficiente 0,55 ($p < 0,05$) para o sêmen bovino. Os obtidos por Ericsson *et al.* (1993) mostraram-se superiores, da ordem de 0,78 ($p < 0,02$). Para o sêmen fresco tem-se verificado correlação entre integridade espermática e a motilidade, avaliada por diferentes métodos, com coeficiente de 0,75 a 0,88 (CASEY *et al.*, 1993), fato este que demonstra ser a estimativa da motilidade espermática progressiva um método que permanece como um indicador confiável para a viabilidade do sêmen. A viabilidade do oócito no trato genital envolve um período de 8 a 10 horas (HUNTER, 1990). Se baseado nos resultados de motilidade obtidos no TTR, provavelmente os espermatozóides no pós-descongelamento tiveram tempo suficiente para a fecundação, uma vez que o seu transporte no órgão genital feminino foi facilitado pela IA no ápice do corno ipsilateral à ovulação.

Quanto à concentração, não houve diferença entre as diferentes concentrações, mostrando que ambas obtiveram índices de gestação satisfatória. Atualmente, na produção animal existe grande preocupação com a redução dos custos e com o aumento da produtividade. A diminuição da concentração espermática por dose inseminante proporciona maior aproveitamento do ejaculado e economia do garanhão, tornando a técnica de IA com sêmen congelado uma metodologia viável e de fácil aplicação.

3.3.1.8. Conclusão

Tanto as curvas de congelamento (horizontal e vertical) como a concentração de 150 e 300 milhões de espermatozóide viáveis utilizados foram eficientes na manutenção da integridade dos espermatozóides eqüinos uma vez que o resultado de prenhez obtidas neste estudo foi satisfatório para a espécie eqüina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISEN, E. G.; MEDINA, V. H.; VENTURINO, A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentration. *Theriogenology*, v. 57, p. 1801-1808, 2002.
- ALVARENGA, M. A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MOREIRA, R. M.; CESARINO, M. M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet. J.*, v. 32, n. 6, p. 541-545, 2000.
- ALVARENGA, M. A.; LEÃO, K. M.; PAPA, F. O. *et al.* Improvement of stallion sêmen pos-thaw motility with the utilization of dimethyl-formamide as cryoprotector. *Theriogenology*, v. 57, p. 459, 2002.
- ALVARENGA, M. A.; ONOE, E.; FONSECA, H. *et al.* Utilização da inseminação artificial por endoscopia na aplicação de sêmen congelado de garanhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 14., 2001. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. *Anais...* Belo Horizonte, 2001, p. 361-362.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. p.769-789.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W.; Principle of crypreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, v. 7, p. 147, 1987.
- ARNS, M. J.; WEBB, G. W.; KREIDER, J. L.; POTTER, G. D.; EVANS, J. W. Use of different nonglycolysable sugars to mantain stallion sperm viability when frozen or stored at 37 °C and 5 °C in bovine serum albumine medium. *J. Reprod. Fertil.* (suppl.), v. 35, p. 135-141, 1987.

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

BARTH, A. D.; OKO, R. J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, IA: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BIELANSKI, W.; DUDEK, E.; BITTMAR, A. Some characteristic of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)*, n. 32, p. 21-26, 1982.

BORG, K.; COLENBRANDER, B.; FAZELI, A.; PARLEVLIET, J.; MALMGREN, L. Influence of thawing method on motility, plasma membrane integrity and morphology of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 48, p. 531-36, 1997.

BRISKO, S. P.; VAN WAGNER, G. S.; GRAHAM, J. K. *et al.* Motility, morphology and triple stain analysis of fresh, cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, v. 56, p. 111-120, 2000.

CAIZA DE LA CUEVA, F. I.; RIGAU, T.; BONET, S.; MIRÓ, J.; BRIZ, M.; RODRIGUEZ-GILL, J.E. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: Effects of oubain. *Theriogenology*, v.47, p.765-784, 1997.

CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K. R. *et al.* Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J. Androl.*, v. 14, p. 289-97, 1993.

COCHRAN, J. D.; AMANN, R. P.; FROMAN, D. P. *et al.* Effects of centrifugation, glycerol level cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, v. 2, n. 1, p. 25-8 July, 1984.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2. Ed. Belo Horizonte: 1998. p. 25-27.

CORREA, J. R.; ZAVOS, P. M. The hypoosmotic swelling test: its employment as and assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, v. 42, p. 351-360, 1994.

COTTORELLO, A. C. *Criopreservação de sêmen eqüino utilizando associação de etilenoglicol e glicerol*. 2002. 47 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

CRISTANELLI, M. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. *et al.* Fertility of stallion semen processed, frozen and thawed by a new procedure. *Theriogenology*, v. 22, n. 1, p. 39-45, 1984.

CRISTANELLI, M. J.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L. Effects of egg yolk and glycerol levels in lactose-EDTA-egg yolk extender and of freezing rate on the motility of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 24, p. 681-685, 1985.

DARNNEL, J.; LODISH, H.; BALTIOMORE, D. Active transport of ions and ATP hydrolysis. In: DARNNEL, J.; LODISH, H.; BALTIOMORE, D. (Ed.) *Molecular cell biology*. New York: Scientific American Books, 1986. p. 625-628.

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

DOBRINSKI, I.; LULAI, CBARTH, A. D.; POST, K. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, v. 47, p. 291-296, 1993.

DOEBBLER, G. F. Crioprotective compounds – review and discussion of structure and function of structure and function. *Cryobiol.*, v. 4, p. 2-11, 1966.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; BURNS, P. J.; DRISCOLL, D. D. Fertility and characteristics of slow-cooled stallion semen. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, n. 35, p. 649-650, 1987.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, v. 47, p. 243-255, 1993.

ERICSSON, S. A. ; GARNER, D. L. ; THOMAS, C. A. *et al.* Interrelationship among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 39, p. 1009-24, 1993.

FAHY, G. M. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*, v. 3, p. 1-13, 1996.

FAHY, G. M.; LILLEY, T. H.; LINSDELL, H.; DOUGAS, M. S.; MERYMAN, H. T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, v. 27, p. 247-268, 1990.

FARRANT, J. Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. *Nature*, v. 205, p. 1284-7, 1965.

FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 251-260, 1996.

FLEURY, J. J.; CASSOLI, P. D. Inseminação artificial em eqüino com baixa dose de sêmen congelado. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, v. 27, p. 234, 1999.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F. *et al.* Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 25, n. 3, p. 436-438, 2001.

FÜRST, R. *Efeito do resfriamento no sêmen eqüino sobre sua congelabilidade.* 2000. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2000.

FÜRST, R.; CARVALHO, G. R.; FÜRST, M. C. O. *et al.* Efeito do resfriamento do sêmen eqüino sobre sua congelabilidade. *Arq. Bras. Vet. Zootec.*, v. 57, n. 5, p. 599-607, 2005.

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A. *et al.* Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol Reprod.*, v. 34, p. 127-38, 1986.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W. *et al.* The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrossomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 34, p. 399-404, 1999.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. North. Am.: Equine Practice*, v. 12, p. 131-147, 1996.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, v. 29, p. 26-28, 1992.

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

HAMMERSTEDT, R. H.; HAY, S. R. Effect of incubation temperature on motility and cAMP content of bovine sperm. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 199, p. 427-437, 1980.

HANCOCK, J. L. The morphology of boar spermatozoa. *J. Roy. Microsc. Soc.*, v. 76, p. 84-97, 1957.

HANDA, A.; NAGASE, H. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 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.

HUNTER, R. H. F. Gamete lifespan in the mare's genital tract- Editorials. *Equine Veterinary Journal*, v. 22, n. 6, p. 378-379, 1990.

JANUSKAUSKAS, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta Vet. Scand.*, v. 36, p. 571-4, 1995.

- JASKO, D. J. P. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars. Veterinaria*, v. 10, n. 2, p. 156-165, 1994.
- JASKO, D. J.; MORAN, D. M.; FARLIN, M. E. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoa motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, v. 35, n. 6, p. 1059-1067, 1991.
- JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; MORAN, D. M. *et al.* Comparison of pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen semen. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 12., 1992, Hague. *Proceedings...* Hague: Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, 1992. p. 1439-1441.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VER, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M. *et al.* Development of an assay the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.*, v. 70, p. 219-228, 1984.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VER, H. H.; ZANEVELD, L. J. D. The hyposmotic swelling test: an update. *Arch. of Androl.*, v. 29, p. 105-116, 1992.
- JONDET, R. *Contributin a l' amelioration de la technologie du sperme de taureau*. Rennes, 1980. 166 f These (Docteur) – UER de Sciences Biologiques, Université de Rennes.
- KEITH, S. L. *Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa*. Colorado, 1998. 104 f. Thesis (Master of Science) – Colorado State University, Fort Collins.
- KENNY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W. L. *et al.* Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. *Proc. Am. Assoc. Equine Prac.*, v. 21, p. 327-336, 1975.
- KLÖPPE, L. H.; VARNER, D. D.; ELMORE, R. G *et al.* Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 29, n. 2, p. 429-439, 1988.
- KRAUSE, D.; GROVE, D. Deep-freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form. *J. Reprod. Fert.*, n. 14, p. 139-141, 1967.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hyposmotic test. *Theriogenology*, v. 39, p. 1279-1289, 1993.
- LEIBO, S. P.; BRADLEY, L. Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: GAGNON, C (Ed.). *The male gamete: from basic science to clinical applications*. Viena: Cache River Press, 1999. p. 501-516.
- LEIPOLD, S. D.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. *et al.* Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology*, v. 49, n. 8, p. 1537-1543, 1998.

- LINDE-FORSBERG, C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extend semen. *Vet Clin. of North America: Small ANIM. Pract.*, v. 21, p. 467-485, 1991.
- LINDSEY, A. C.; VARNER, D. D.; SEIDEL JR. *et al.* Hysteroscopic or rectally guided, deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18 h at either or 15 °C prior to flow – cytometric sorting. *Theriogenology*, v. 58, p. 659-662, 2002.
- LOVE, C. C.; LOCH, W. L.; BRISTON, F.; GARCIA, C.; KENNY, R. M. Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging methods. *Theriogenology*, v. 31, n. 3, p. 613-622, 1989.
- MAGISTRINI, M.; COUTY, Y.; PALMER, E. Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluents on fresh stallion sperm survival. *Acta Vet Scand. (Suppl.)*, v. 88, p. 97-110, 1992.
- MARTIN, J. C.; KLUG, E.; GUNZEL, A. R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *J. Reprod. Fert. (Supply.)*, n. 27, p. 47-51, 1979.
- MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; SCHEFFEN, B.; ECTORS, F. Pregnancies following transfer of cattle-embryos preserved by vitification. *Cry-letters*, v. 7, p. 270-273, 1986.
- MAZUR, P. Basic concepts in freezing cells. In: PROC. 1^o INTERNATIONAL CONF. DEEP FREEZING BOAR SEMEN. Uppsala, Sweden, p. 91-111, 1985.
- MAZUR, P. Freezing of having cells mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, v. 247, p. 251-272, 1984.
- MAZUR, P. The role of intracellular freezing in death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology.*, San Diego, v. 247, p. 251-272, 1977.
- MCKINNON, A. O. Artificial insemination of cooled, transported and frozen semen. *Austr. Equi. Vet. J.*, v. 14, n. 4, p. 156-175, 1996.
- MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T. D.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v. 57, p. 327-344, 2002.
- MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.*, v. 51, n. 1, p. 71-78, 1999.
- MERCANTE, C. F. J.; ARRUDA, R. P.; NEVES NETO, J. R. *et al.* Congelamento de sêmen equino em etilenoglicol ou glicerol: motilidade, vigor e teste de termoresistencia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995. *Anais...* Belo Horizonte. MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 290.

MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold-shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 38, p. 291-304, 1992.

MORRIS, L. H. A.; TIPLADY, C.; COOK, B.; WILSTER, S.; LI, X.; ALLEN, W. R. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of frozen-thawed ejaculated and epididymal spermatozoa. In: Havemeyer Foundation Workshop, 5th International Symposium on Equine Embryo Transfer. Saari, Finland, 6th-9th July, p. 12, 2000.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINTURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695-1706, 2002.

MULLER, J. practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, n. 35, p. 121-125, 1987.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUERO. Hypoosmotic test in equine spermatozoa *Theriogenology*, v. 51, p. 721-727, 1999.

NEVES NETO J. R.; MERCANTE, C. F. J.; ARRUDA, R. P. *et al.* Fertilidade do semen equino congelado com etilenoglicol ou glicerol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995. *Anais...* Belo Horizonte. MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1995, p. 292.

PAPA, F. O. *et al.* A comparative study between the freezability and fertility of stallion semen using different extenders. Baltimore. *Proceedings ...* Baltimore 1998, p. 140-141.

PAPA, F. O.; ZAHN, F. S.; DELL'AQUA JR., J. A.; ALVARENGA, M. A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 26, n. 3, p. 184-187, 2001.

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

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v. 29, p. 255-266, 1992.

PICKETT, B.W. Pinciples of crypreservation. In: THECNiques FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS, 1986. *Proceeding...* Fot Collins Colorado State University, 1986. p. 1-5.

PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). *Equine reproduction*. Philadelphia: Lea e Febiger, 1993. p. 769-789.

- PICKETT, B. W.; MARTIG, R. C.; COWAN, W. A. Preservation of bovine spermatozoa at -79 and 198 °C. *J. Dairy Sci.*, v. 44, p. 2089-96, 1961.
- PINTO, P. A.; SANTOS, A. E.; VALE FILHO, V. R *et al.* Tecnologia de sêmen-teste de termorresistência de sêmen bovino, utilizando-se animais *Bos taurus* e *Bos indicus*. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE VETERINÁRIA DE LÍNGUA PORTUGUESA, 1., 1978, São Paulo, *Anais ...* São Paulo, 1978. p. 77.
- QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fert.*, v. 60, p. 403-407, 1980.
- ROTA, A.; LINDE-FORSBERG, C.; VANOZZI, J.; ROMAGNOLI, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. In: ROTA, A. (Ed.) *Studies on preservation, capacitation and fertility of dog spermatozoa*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, 1998. p. 1-15.
- RUDOLPH, A. S.; CROWE, J. H. *et al.* Interaction of cryoprotectants with lipids bilayers. *Cryobiology* (abstracts), v. 23, p. 543, 1986.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 77-111, 2000.
- SAMPER, J. C. Evaluation of cryopreserved semen: an alternative assay. *Acta Veterinaria Scandinavica* (Supplement), v. 88, p. 59-65, 1992.
- SAMPER, J. C.; HEARN, P. H.; GANHEIM, A. Pregnancy rates and effect of extender and motility and acrosome status of frozen-thawed stallion spermatozoa. In: *Proceedings*. 40th Ann. Conv. Amer. Assoc. Equine Practice, 1994. p. 41-43.
- SEIDEL, G. E. Principles of mammalian embryos. In: TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYOS, 1986, Fort Collins. *Proceeding...* Colorado State University, 1986. p. 6-12.
- SIEME, H.; PETZOLDT, R.; KAPP, S. *et al.* Analyses to determine the minimum cellular water content under different storage conditions in relation to preservation of stallion spermatozoa. In Proc. 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE REPRODUCTION PRETORIA, July 1998, p. 31-31.
- SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic of the structure of cell membranes. *Science*, n. 175, p. 720-731, 1972.
- SMITH, J. F.; MURRAY, G. R. Evaluation of different techniques for determination of membrane status in spermatozoa. Staining techniques in spermatozoa. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, v. 57, p. 246-250, 1997.

SNOECK, P. P. N.; HENRY, M.; SANTOS, L. M. G. Avaliação de crioprotetores no congelamento de sêmen eqüino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 25, n. 3, p. 454-455, 2001.

SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P.; McKINNON, A. O. Preservation of stallion semen *In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS*, 33., 1987. *Proceedings...* 1987. p. 475-486.

SQUIRES, E. L.; KEITH, S. L.; GRAHAM, J. K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 62, p. 1056-1065, 2004.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Principles of cryopreservation. *In: Cooled and frozen Stallion Semen*, b.09, 1999.

SQUIRES, E. L.; REGER, H. P.; MACLELLAN, L. J. *et al.* Effect of insemination and site of insemination on pregnancy rate with frozen semen. *Theriogenology*, v. 58, p. 655-658, 2002.

STOREY, B. T.; NOILES, E. E.; THOMPSON, K. A. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, v. 37, p. 46-58, 1998.

TRIMECHE, A.; YVON, J. M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E. MAGISTRINI, M. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 52, p. 181-191, 1990.

TRIMECHE, A.; YVON, J. M.; VIDAMENT, M.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 52, p. 181-191, 1990.

VASQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology*, v. 47, p. 913-922, 1997.

VERHOVEM, B.; SCHLEGEL, R. A., WILLIAMSON, P. Rapid loss and restoration of lipid asymmetry by different pathways in resealed erythrocyte ghosts. *Biochemica and Biophysica Acta*, v. 1104, p. 15-23, 1992.

VIDAMENT, M.; COGNARD, E.; YVON, J. M. *et al.* Evaluation of stallion semen before and after freezing. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 33, p. 271-277, 1998.

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

VIDAMENT, M.; DUPERE, C.; YVON, J. M. *et al.* Equine frozen semen freezability and fertility results. *Theriogenology*, v. 48, p. 907-917, 1997.

VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P. *et al.* Centrifugation and addition of glicerol at 22 °C instead of 4 °C improve frozen stallion semen motility and fertility. *Thriongenology*, v. 54, p. 907-919, 2000.

VIDAMENT, M.; YVON, J. M.; COUTY, I. *et al.* Advances in cryopreservation in modified INRA 82. *Animal Reproduction Science*, v. 68. p. 201-218, 2001.

VON BUITEN, A.; ZHANG, J.; VERMEULEN, L.; SCHOOJANS, F.; COMHAIRE, F. H. Evaluation of the hypo-osmotic swelling test in relation with advanced methods of semen analysis. *Andrologia*, v. 24, p.213-217, 1992.

WATSON, P. F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, 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.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: MORRIS, G. J.; CLARKE, A. (Ed.) *Effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press, p.189, 1981.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 5, n. 6, p. 639-658, 1993.

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility and acrossomal integrity of stallion spermatozoa prior and after cryopreservation. *Cryobiology*, v. 33, p. 320-329, 1996.

WOELDERS, H. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. In: JOHNSON, L. A.; RATH, D. (Ed.) *Reproduction of domestic animals*. Berlin: Paul Parey, 1991, p. 145-164. Proceedings of the Second International Conference on boar Semen Preservation, 1991.

YILDIZ, C.; KAYA, A.; AKSOY, M.; TEKELI, T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrossomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, v. 54, p. 579-585, 2000.

ZÚCCARI, C. E. S. N. *Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina*. Botucatu: UNESP. Tese (Doutorado), 1998. 121 p.

ANEXO

ANEXO A

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

1. EXPERIMENTO 1

1.1. Análise do sêmen fresco em três diferentes tempos de equilíbrio

Volume do ejaculado

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	2	2403.333	1201.667	7.670	0.00715
Resíduo	12	1880.000	156.6667		

Coeficiente de Variação = 34.136

Variável = Volume (156.6667)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
3	5	52.0000	A
1	5	37.0000	AB
2	5	21.0000	B

Concentração

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	2	2909.733	1454.867	6.939	0.00994
Resíduo	12	2516.000	209.6667		

Coeficiente de Variação = 35.202

Variável = Concentração (209.6667)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
2	5	60.6000	A
3	5	34.0000	B
1	5	28.8000	B

Motilidade

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	2	93.33333	46.66667	0.800	*****
Resíduo	12	700.0000	58.33333		

Coeficiente de Variação = 11.287

Vigor

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	2	0.2333333	0.1166667	0.875	*****
Resíduo	12	1.600000	0.1333333		

Coeficiente de Variação = 8.427

Host

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	2	1354.133	677.0667	6.525	0.01209
Resíduo	12	1245.200	103.7667		

Coeficiente de Variação = 25.049

Variável = Supravital (103.7667)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
----------	-------	--------	----------------

3	5	52.8000	A
1	5	39.6000	AB
2	5	29.6000	B

Supravital (mortos)

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	2	2031.600	1015.800	16.818	0.00033
Resíduo	12	724.8000	60.40000		

Coeficiente de Variação = 39.251

Variável = Supravital (60.40000)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
----------	-------	--------	----------------

2	5	36.2000	A
1	5	12.8000	B
3	5	10.4000	B

1.2. Patologia do sêmen fresco em diferentes tempos de equilíbrio

Acrossoma

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	2	24.40000	12.20000	0.956	*****
Resíduo	12	153.2000	12.76667		

Coeficiente de Variação = 77.675

Gota protoplasmática proximal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	2	14.53333	7.266667	1.772	0.21164
Resíduo	12	49.20000	4.100000		

Coeficiente de Variação = 178.663

Cauda fortemente dobrada

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	2	25.73333	12.86667	0.799	*****
Resíduo	12	193.2000	16.10000		

Coeficiente de Variação = 81.334

Peça intermediária

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	2	18.53333	9.266667	1.193	0.33682
Resíduo	12	93.20000	7.766667		

Coeficiente de Variação = 130.635

Cabeça isolada normal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	2	0.1333333	0.6666667E-01	0.286	*****
Resíduo	12	2.800000	0.2333333		

Coeficiente de Variação = 181.142

1.3. Análise do sêmen no pós-descongelamento em diferentes tempos de equilíbrio

Motilidade TTR 0

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	130.0000	65.00000	0.650	*****
Resíduo	42	4200.000	100.0000		

Coeficiente de Variação = 20.979

Motilidade TTR 20

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	347.7778	173.8889	1.714	0.19243
Resíduo	42	4260.000	101.4286		

Coeficiente de Variação = 21.789

Motilidade TTR 40

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	223.3333	111.6667	0.716	*****
Resíduo	42	6546.667	155.8730		

Coeficiente de Variação = 29.035

Motilidade TTR 60

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	223.3333	111.6667	0.531	*****
Resíduo	42	8826.667	210.1587		

Coeficiente de Variação = 36.242

Motilidade TTR 90

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	573.3333	286.6667	1.114	0.33771
Resíduo	42	10806.67	257.3016		

Coeficiente de Variação = 46.720

Vigor TTR 0

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	0.2111111	0.1055556	0.646	*****
Resíduo	42	6.866667	0.1634921		

Coeficiente de Variação = 11.163

Vigor TTR 20

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	0.5777778	0.2888889	1.604	0.21326
Resíduo	42	7.566667	0.1801587		

Coeficiente de Variação = 11.827

Vigor TTR 40

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	0.8444444	0.4222222	1.756	0.18522
Resíduo	42	10.10000	0.2404762		

Coeficiente de Variação = 14.470

Vigor TTR 60

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	1.211111	0.6055556	1.448	0.24657
Resíduo	42	17.56667	0.4182540		

Coeficiente de Variação = 20.071

Vigor TTR 90

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	1.811111	0.9055556	1.025	0.36754
Resíduo	42	37.10000	0.8833333		

Coeficiente de Variação = 31.800

Host no TTR 0

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	713.2000	356.6000	2.981	0.06157
Resíduo	42	5024.000	119.6190		

Coeficiente de Variação = 39.819

Supravital (mortos) no TTR 0

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	50.97778	25.48889	0.281	*****
Resíduo	42	3808.267	90.67302		

Coeficiente de Variação = 39.819

1.4. Patologia do sêmen no pós-descongelamento em diferentes tempos de equilíbrio

Acrossoma

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	41.37778	20.68889	0.829	*****
Resíduo	42	1047.867	24.94921		

Coeficiente de Variação = 60.260

Gota protoplasmática proximal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	0.4444444	0.2222222	1.000	0.37647
Resíduo	42	0.9333333	0.2222222		

Coeficiente de Variação = 670.820

Fortemente dobrada

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	2.177778	1.088889	0.138	*****
Resíduo	42	330.4000	7.866667		

Coeficiente de Variação = 88.262

Peça intermediária

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	6.977778	3.488889	1.324	0.27692
Resíduo	42	110.6667	2.634921		

Coeficiente de Variação = 178.161

Estreita na base

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	0.8444444	0.4222222	0.284	*****
Resíduo	42	62.40000	1.485714		

Coeficiente de Variação = 249.320

Cabeça isolada normal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	2	0.4000000	0.2000000	3.500	0.03928
Resíduo	42	2.400000	0.571428		

Coeficiente de Variação = 358.569

2. EXPERIMENTO 2

2.1. Análise sêmen fresco de garanhões da raça bretão

Volume

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	405.3444	405.3444	1.332	0.26533
Resíduo	16	4867.600	304.2250		

Coeficiente de Variação = 29.535

Concentração

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	40111.11	40111.11	2.910	0.10739
Resíduo	16	220580.0	13786.25		

Coeficiente de Variação = 73.949

Motilidade

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	8.402778	8.402778	0.144	*****
Resíduo	16	931.8750	58.24219		

Coeficiente de Variação = 18.439

Vigor

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	0.7111111	0.7111111	5.988	0.02632
Resíduo	16	1.900000	0.1187500		

Coeficiente de Variação = 10.695

Host

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	26.13611	26.13611	0.241	*****
Resíduo	16	1732.975	108.3109		

Coeficiente de Variação = 23.014

Supravital

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	132.0111	132.0111	2.609	0.12581
Resíduo	16	809.6000	50.60000		

Coeficiente de Variação = 37.994

2.2. Patologia sêmen fresco de garanhões da raça bretões

Acrossoma

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	0.2041667	0.2041667	0.188	*****
Resíduo	14	15.23333	1.088095		

Coeficiente de Variação = 79.476

Gota protoplasmática proximal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	2.604167	2.604.167	0.020	*****
Resíduo	14	1835.833	131.1310		

Coeficiente de Variação = 112.405

Cauda fortemente dobrada

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	395.2667	395.26	132.6	.00000
Resíduo	14	41.73333	2.980952		

Coeficiente de Variação = 36.348

P.I

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	1.666667	1.66	1.00	0.33428
Resíduo	14	23.3	1.66		

Coeficiente de Variação = 172.133

Cabeça estreita na base

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	0.000000	0.000000	0.0	****
Resíduo	14	6.000000	0.4285714		

Coeficiente de Variação = 130.931

Cabeça isolada normal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	0.9375000	0.9375000	8.75	0.01038
Resíduo	14	1.500000	0.1071429		

Coeficiente de Variação = 174.574

Cabeça isolada patológica

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	0.1041667	0.1041667	1.750	0.20
Resíduo	14	0.8333333	0.5952381		

Coeficiente de Variação = 390.360

2.3. Análise do sêmen da raça bretão no pós-descongelamento

Motilidade TTR 0

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	270.4094	270.4094	3.58	0.07545
Resíduo	17	1282.222	75.42484		

Coeficiente de Variação = 17.936

Motilidade TTR 20

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	432.5146		5.82	0.02737
Resíduo	17	1262.222	74.24837		

Coeficiente de Variação = 19.375

Motilidade TTR 40

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	870.4094	870.4094	12.0	0.00296
Resíduo	17	1232.222	72.48366		

Coeficiente de Variação = 20.476

Motilidade TTR 60

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	988.3041	988.3041	9.48	0.00681
Resíduo	17	1772.222	104.2484		

Coeficiente de Variação = 26.758

Motilidade TTR 90

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	88.94737	88.94737	0.741	*****
Resíduo	17	2040.000	120.0000		

Coeficiente de Variação = 45.744

Vigor TTR 0

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	2.070322	2.070322	11.3	0.00370
Resíduo	17	3.113889	0.1831699		

Coeficiente de Variação = 13.222

Vigor TTR 20

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	1.237427	1.237427	9.19	0.0075
Resíduo	17	2.288889	0.1346405		

Coeficiente de Variação = 11.620

Vigor TTR 40

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	1.264474	1.264474	10.6	0.0046
Resíduo	17	2.025000	0.1191176		

Coeficiente de Variação = 11.114

Vigor TTR 60

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	0.8668129	0.866	4.116	0.058
Resíduo	17	3.580556	0.2106209		

Coeficiente de Variação = 15.571

Vigor TTR 90

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	0.1690058	0.1690058	0.720	****
Resíduo	17	3.988889	0.2346405		

Coeficiente de Variação = 21.913

Host

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	43.58421	43.58421	1.01	0.327
Resíduo	17	728.1000	42.82941		

Coeficiente de Variação = 19.675

Supravital

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	312.5000	312.5000	7.95	0.0123
Resíduo	16	629.1111	39.31944		

Coeficiente de Variação = 33.492

2.4. Patologia do sêmen no pós-descongelamento de garanhões da raça bretão**Acrossoma**

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	262.5042		5.45	0.035
Resíduo	14	674.4333	48.17381		

Coeficiente de Variação = 62.741

Gota protoplasmática proximal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	0.9375000	0.9375000	0.022	****
Resíduo	14	600.5000	42.89286		

Coeficiente de Variação = 283.211

Cauda fortemente dobrada

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	592.2042	592.2042	105.98	0.000
Resíduo	14	78.23333	5.588095		

Coeficiente de Variação = 49.120

P.I

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	11.70417	11.70417	2.81	0.1156
Resíduo	14	58.23333	4.159524		

Coeficiente de Variação = 130.527

Cabeça estreita na base

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	2.400000	2.400000	0.1108	
Resíduo	14	11.60000	0.8285714		

Coeficiente de Variação = 182.052

Cabeça isolada normal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	2.016667	2.016667	2.056	0.1736
Resíduo	14	13.73333	0.9809524		

Coeficiente de Variação = 264.115

Cabeça isolada patológica

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	1	0.2041667	0.2041667	1.28	0.27693
Resíduo	14	2.233333	0.1595238		

Coeficiente de Variação = 213.016

2.5. Análise do sêmen fresco garanthões da raça Mangalarga Marchador

Volume

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	3399.171	679.8342	3.651	0.01287
Resíduo	25	4654.700	186.1880		

Coeficiente de Variação = 34.058

Variável = VOL (186.1880)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
1	6	52.5000	A
3	5	51.2000	A
2	5	45.6000	A
6	5	31.6000	A
5	5	29.0000	A
4	5	28.0000	A

Concentração

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	60647.28	12129.46	4.255	0.00617
Resíduo	25	71258.40	2850.336		

Coeficiente de Variação = 57.687

Variável = CONC (2850.336)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
4	5	172.0000	A
5	5	121.0000	AB
2	5	88.4000	AB
1	6	85.0000	AB
3	5	60.0000	B
6	5	30.4000	B

Motilidade

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	487.8763	97.57527	1.741	0.1617
Resíduo	25	1400.833	56.03333		

Coeficiente de Variação = 11.024

Motilidade

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	463.7634	92.75269	1.20	0.335
Resíduo	25	1923.333	76.93333		

Coeficiente de Variação = 17.319

Vigor

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	118.0605	23.61210	1.070	0.4007
Resíduo	25	551.8750	22.07500		

Coeficiente de Variação = 98.746

Host

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	2551.941	510.3882	9.363	0.00004
Resíduo	25	1362.833	54.51333		

Coeficiente de Variação = 14.111

Variável = 100 (54.5133)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
3	5	69.0000	A
5	5	58.2000	B
2	5	54.0000	BC
1	6	47.1667	BC
4	5	43.6000	C
6	5	43.0000	C

Supravital

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	1228.302	245.6604	2.334	0.07192
Resíduo	25	2631.633	105.2653		

Coeficiente de Variação = 63.106

2.6. Patologia do sêmen fresca garanthões da raça Mangalarga Marchador

Acrossoma

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	38.66667	7.733333	2.468	0.06122
Resíduo	24	75.20000	3.133333		

Coeficiente de Variação = 85.651

Gota protoplasmática proximal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	137.3667	27.47333	1.765	0.15837
Resíduo	24	373.6000	15.56667		

Coeficiente de Variação = 108.591

Cauda fortemente dobrada

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	56.66667	11.33333	2.96	0.03224
Resíduo	24	92.00000	3.833333		

Coeficiente de Variação = 53.397

Variável = **Cauda fortemente dobrada** (3.833333)

GARANHÃO Dados Médias Comparações 5%

3	5	5.4000	A
2	5	4.4000	AB
4	5	4.2000	AB
6	5	4.2000	AB
5	5	2.6000	AB
1	5	1.2000	B

P.I

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	59.86667	11.97333	1.384	0.26534
Resíduo	24	207.6000	8.650000		

Coeficiente de Variação = 83.238

Cabeça estreita na base

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	15.90000	3.180000	0.691	*****
Resíduo	24	110.4000	4.600000		

Coeficiente de Variação = 126.162

Cabeça isolada normal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	7.766667	1.553333	2.82	0.03823
Resíduo	24	13.20000	0.5500000		

Coeficiente de Variação = 117.098

Variável = **Cabeça isolada normal** (0.55000)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
2	5	1.6000	A
4	5	0.8000	AB
1	5	0.6000	AB
5	5	0.6000	AB
6	5	0.2000	B
3	5	0.0000	B

Cabeça isolada patológicas

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	0.7000000	0.1400000	1.680	0.17777
Resíduo	24	2.000000	0.83333		

Coeficiente de Variação = 288.675

2.7. Análise do sêmen da raça Mangalarga Marchador no pós-descongelamento

Motilidade no TTR 0

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	987.7419	197.5484	2.940	0.032
Resíduo	25	1680.000	67.20000		

Coeficiente de Variação = 18.415

Variável = M1 (67.20000)
 GARANHÃO Dados Médias Comparações 5%

4	5	55.0000	A
6	5	47.0000	AB
2	5	45.0000	AB
5	5	44.0000	AB
1	6	40.0000	B
3	5	37.0000	B

Motilidade no TTR 20

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	1380.134	276.0269	3.223	0.0221
Resíduo	25	2140.833	85.63333		

Coeficiente de Variação = 22.588

Variável = M2 (85.6333)
 GARANHÃO Dados Médias Comparações 5%

4	5	54.0000	A
6	5	45.0000	AB
5	5	40.0000	AB
2	5	38.0000	AB
3	5	36.0000	B
1	6	34.1667	B

Motilidade no TTR 40

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	1158.710	231.7419	2.25	0.0810
Resíduo	25	2580.000	103.2000		

Coeficiente de Variação = 26.802

Motilidade no TTR 60

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	910.1344	182.0269	1.812	0.147
Resíduo	25	2510.833	100.4333		

Coeficiente de Variação = 27.863

Motilidade no TTR 90

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	1148.710	229.7419	2.1	0.0995
Resíduo	25	2740.000	109.6000		

Coeficiente de Variação = 32.617

Vigor no TTR 0

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	295.6860	59.13720	0.79	*****
Resíduo	25	1873.733	74.94933		

Coeficiente de Variação = 149.931

Vigor no TTR 20

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	2.493548	0.4987097	2.9	0.0308
Resíduo	25	4.200000	0.1680000		

Coeficiente de Variação = 12.277

Variável = V2 (0.1680)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
4	5	3.8000	A
6	5	3.6000	AB
2	5	3.4000	AB
5	5	3.2000	AB
3	5	3.1000	AB
1	6	3.0000	B

Vigor no TTR 40

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	3.875538	0.7751075	3.172	0.02363
Resíduo	25	6.108333	0.2443333		

Coefficiente de Variação = 15.797

Variável = V3 (0.244333)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
4	5	3.5000	A
6	5	3.5000	A
2	5	3.4000	A
5	5	3.0000	A
3	5	2.9000	A
1	6	2.5833	A

Vigor no TTR 60

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	5.233602	1.046720	4.355	0.00548
Resíduo	25	6.008333	0.2403333		

Coefficiente de Variação = 16.254

Variável = V4 (0.2403333)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
2	5	3.4000	A
4	5	3.4000	A
6	5	3.4000	A
5	5	3.0000	AB
3	5	2.6000	AB
1	6	2.4167	B

Vigor no TTR 90

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	4.779839	0.9559677	3.378	0.01816
Resíduo	25	7.075000	0.2830000		

Coeficiente de Variação = 18.426

Variável = V5 (0.2830000)

GARANHÃO	Dados	Médias	Comparações 5%
4	5	3.3000	A
6	5	3.3000	A
2	5	3.1000	AB
5	5	2.9000	AB
3	5	2.6000	AB
1	6	2.2500	B

Host

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	66.58602	13.31720	0.190	*****
Resíduo	25	1756.833	70.27333		

Coeficiente de Variação = 29.699

Supravital

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	1195.544	239.1088	2.18	0.087
Resíduo	25	2732.133	109.2853		

Coeficiente de Variação = 30.259

2.8. Patologia do sêmen da raça Mangalarga Marchador no pós-descongelamento

Acrossoma

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	329.1742	65.83484	4.708	0.0036
Resíduo	25	349.6000	13.98400		

Coeficiente de Variação = 65.867

Variável = ACROSS (13.98400)

GARANHÃO Dados Médias Comparações 5%

4	5	12.2000	A
3	5	6.4000	B
1	6	6.0000	B
6	5	4.6000	B
2	5	2.4000	B
5	5	2.4000	B

Gota protoplasmática proximal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	2.654839	0.5309677	0.795	*****
Resíduo	25	16.70000	0.6680000		

Coeficiente de Variação = 211.139

Cauda fortemente dobrada

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	37.01935	7.403871	1.442	0.244
Resíduo	25	128.4000	5.136000		

Coeficiente de Variação = 101.818

P.I

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	14.93871	2.987742	0.	***
Resíduo	25	101.9000	4.076000		

Coeficiente de Variação = 111.761

Cabeça estreita na base

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	4.653763	0.9307527	0.265	*****
Resíduo	25	87.73333	3.509333		

Coeficiente de Variação = 145.182

Cabeça isolada normal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	5	3.708602	0.7417204	0.617	*****
Resíduo	25	30.03333	1.201333		

Coeficiente de Variação = 226.518

3. EXPERIMENTO 3

3.1. Avaliação do sêmen fresco de cinco ejaculados de cinco garanhões da raça MM

Volume

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	P
GARANHÃO	4	2247.628	561.9071	2.204	0.10345
Resíduo	21	5353.333	254.9206		

Coefficiente de Variação = 44.398

Concentração

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	P
GARANHÃO	4	8378.082	2094.521	6.053	0.00211
Resíduo	21	7266.533	346.0254		

Coefficiente de Variação = 38.142

Variação = CONC (346.0254)

GARANHÃO	Dados	médias	Comparação 5%
5	5	79.6000	A
1	5	58.0000	AB
4	5	46.0000	B
2	5	32.0000	B
3	6	31.6667	B

Motilidade Progressiva

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	P
GARANHÃO	4	804.0385	201.0096	4.138	0.01258
Resíduo	21	1020.000	48.57143		

Coefficiente de Variação = 9.929

Variável = MOTT (48.57143)

GARANHÃO	Dados	médias	Comparação 5%
1	5	81.0000	A
2	5	70.0000	B
4	5	69.0000	B
5	5	67.0000	B
3	6	65.0000	B

Vigor

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	P
GARANHÃO	4	4.220513	1.055128	3.196	0.03377
Resíduo	21	6.933333	0.3301587		

Coeficiente de Variação = 15.893

Variação = VIGOR (0.3301587)

GARANHÃO Dados médias Comparação 5%

1	5	4.2000	A
5	5	3.9000	A
4	5	3.7000	A
2	5	3.2000	A
3	6	3.1667	A

Host

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	P
GARANHÃO	4	662.3462	165.5865	1.819	0.16284
Resf duo	21	1911.500	91.02381		

Coeficiente de Variação = 17.060

Supravital

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	P
GARANHÃO	4	730.2051	182.5513	4.330	0.01039
Variação	21	885.3333	42.15873		

Coeficiente de Variação = 36.699

Variável = SUP (42.15873)

GARANHÃO Dados médias Comparação 5%

5	5	27.8000	A
4	5	17.2000	B
3	6	16.6667	B
2	5	15.4000	B
1	5	11.6000	B

3.2. Avaliação da patologia do sêmen fresco de cinco ejaculados de cinco garanhões MM

Acrossoma

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	P
GARANHÃO	4	13.77971	3.444928	1.145	0.36711
Resíduo	18	54.13333	3.007407		

Coeficiente de Variação = 78.208

Gota protoplasmática proximal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	P
GARANHÃO	4	124.3362	31.08406	2.709	0.06305
Resíduo	18	206.5333	11.47407		

Coeficiente de Variação = 146.998

Cauda Fortemente dobrada

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	P
GARANHÃO	4	94.86884	23.71721	6.590	0.00189
Resíduo	18	64.78333	3.599074		

Coeficiente de Variação = 77.918

Variável = FORTDOB (3.599074)

GARANHÃO	Dados	médias	Comparação	5%
5	4	6.2500	A	
1	4	3.7500	AB	
4	5	1.4000	B	
2	4	1.2500	B	
3	6	0.6667	B	

Patologia da peça intermediária

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	P
GARANHÃO	4	114.3014	28.57536	1.849	0.16340
Resíduo	18	278.1333	15.45185		

Coeficiente de Variação = 82.945

Cabeça estreita na base

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
GARANHÃO	4	66.30435	16.57609	1.515	0.23996
Resíduo	18	197.0000	10.94444		

Coeficiente de Variação = 79.260

Cabeça isolada

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado médio	F	P
GARANHÃO	4	3.079710	0.7699275	4.891	0.00757
Resíduo	18	2.833333	0.1574074		

Coeficiente de Variação = 182.503

Variável = CABISOL (0.1574074)

GARANHÃO	Dados	médias	Comparação 5%
3	6	2.0000	A
1	4	1.2500	B
3	6	0.8333	BC
4	5	0.6000	BCD
2	4	0.2500	CD
5	4	0.0000	D

3.3. Sêmen congelado duas diferente taxas de congelamento Horizontal e Vertical submetidas a dois protocolos de descongelamento 37 e 75 °C

Motilidade TTR 0

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	144.6063	144.6063	2.349	0.12918
DESC	1	168.5849	168.5849	2.738	0.10175
TRAT DESC	1	106.7025	106.7025	1.733	0.19163
Resíduo	83	5109.738	61.56311		

Coeficiente de Variação = 14.407

Motilidade TTR 20

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	1472.779	1472.779	15.993	0.00015
DESC	1	155.9874	155.9874	1.694	0.1967
TRAT DESC	1	30.53285	30.53285	0.332	*****
Resíduo	83	7643.344	92.08848		

Coeficiente de Variação = 19.690

Motilidade TTR 40

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	2083.321	2083.321	14.468	0.00028
DESC	1	4.818564	4.818564	0.033	*****
TRAT DESC	1	0.9682964	0.9682964	0.007	*****
Resíduo	83	11951.79	143.9974		

Coeficiente de Variação = 26.297

Motilidade TTR 60

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	1102.531	1102.531	6.94	0.01004
DESC	1	1.996435	1.996435	0.013	*****
TRAT DESC	1	15.09804	15.09804	0.095	*****
Resíduo	83	13178.03	158.7714		

Coeficiente de Variação = 31.501

Motilidade TTR 90

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	2931.828	2931.828	15.85	0.00016
DESC	1	39.15457	39.15457	0.212	*****
TRAT DESC	1	249.4754	249.4754	1.35	0.24875
Resíduo	83	15346.86	184.9019		

Coeficiente de Variação = 41.807

Vigor TTR 0

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	0.7230010	0.7230010	3.71	0.05740
DESC	1	0.5465304	0.5465304	2.80	0.09761
TRAT DESC	1	0.1070155	0.1070155	0.055	*****
Resíduo	83	16.15855	0.1946813		

Coeficiente de Variação = 12.524

Vigor TTR 20

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	0.6724281	0.6724281	3.291	0.07327
DESC	1	0.1194869	0.1194869	0.585	*****
TRAT DESC	1	0.1194869	0.1194869	0.585	*****
Resíduo	83	16.95725	0.2043042		

Coeficiente de Variação = 14.019

Vigor TTR 40

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	1.795015	1.795015	6.747	0.01112
DESC	1	0.1490260	0.1490260	0.560	*****
TRAT DESC	1	0.464094	0.4640947	0.017	*****
Resíduo	83	22.08279	0.2660577		

Coeficiente de Variação = 17.495

Vigor TTR 60

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	2.510721	2.510721	8.195	0.00533
DESC	1	0.2546473	0.2546473	0.000	*****
TRAT DESC	1	0.1043035	0.1043035	0.340	*****
Resíduo	83	25.42965	0.3063814		

Coeficiente de Variação = 19.656

Vigor TTR 90

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	2.407850	2.407850	4.89	0.02966
DESC	1	0.2420741	0.2420741	0.492	*****
TRAT DESC	1	0.2131971	0.2131971	0.434	*****
Resíduo	83	40.81006	0.4916875		

Coeficiente de Variação = 28.374

Supravital (mortos)

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	223.2626	223.2626	5.8	0.0174
DESC	1	4.054011	4.054011	0.107	*****
TRAT DESC	1	22.74064	22.74064	0.60	*****
Resíduo	83	3147.045	37.91621		

Coeficiente de Variação = 38.680

Host

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	584.7533	584.7533	4.32	0.040
DESC	1	258.8068	258.8068	1.91	0.17037
TRAT DESC	1	95.44426	95.44426	0.705	*****
Resíduo	83	11229.97	135.3008		

29.633

Coeficiente de Variação =

3.4. Patologia espermática em diferentes taxas de congelamento horizontal e vertical, submetidas a dois protocolos de descongelamento de 37 e 75 °C

Acrossoma

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	46.36552	46.36552	4.38	0.03913
DESC	1	12.65766	12.65766	1.197	0.27685
TRAT DESC	1	5.052383	5.052383	0.478	*****
Resíduo	87	919.6423	10.57060		

Coeficiente de Variação = 55.096

Cauda fortemente dobrada

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	0.1544074E-30	0.1544074E-30	0.000	*****
DESC	1	9.672692	9.672692	1.626	0.20566
TRAT DESC	1	0.3869077	0.3869077	0.065	*****
Resíduo	87	517.5652	5.949025		

Coeficiente de Variação = 107.747

Peça intermediária

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	0.2220544	0.2220544	0.068	*****
DESC	1	15.07696	15.07696	4.602	
TRAT DESC	1	1.691522	1.691522	0.516	
Resíduo	87	285.0198	3.276089		

Coeficiente de Variação = 102.304

Estreito na base

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	0.8100768	0.8100768	0.510	*****
DESC	1	2.316672	2.316672	1.458	0.23054
TRAT DESC	1	0.8100768	0.8100768	0.510	*****
Resíduo	87	138.2510	1.589092		

Coeficiente de Variação = 94.805

Cabeça isolada normal

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	0.979260	0.979260	0.182	*****
DESC	1	0.1174668	0.1174668	0.218	*****
TRAT DESC	1	0.9792601	0.9792601	0.182	*****
Resíduo	87	4.693676	0.539503		

Coeficiente de Variação = 422.735

Cabeça isolada patológico

Fontes de Variação	G.L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	P
TRAT	1	0.1074744	0.1074744	0.978	*****
DESC	1	0.107474	0.1074744	0.978	*****
TRAT DESC	1	0.1074744	0.1074744	0.978	*****
Resíduo	87	0.9565217	0.1099450		

Coeficiente de Variação = 954.174
