

RENAN REIS DE OLIVEIRA

**EFEITO *IN VITRO* DA INCORPORAÇÃO DE COLESTEROL À MEMBRANA
PLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES CRIOPRESERVADOS DE
JUMENTOS (*Equus asinus*) DA RAÇA PÊGA**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

RENAN REIS DE OLIVEIRA

EFEITO *IN VITRO* DA INCORPORAÇÃO DE COLESTEROL À MEMBRANA
PLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES CRIOPRESERVADOS DE
JUMENTOS (*Equus asinus*) DA RAÇA PÊGA

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

Aprovada: 23 de fevereiro de 2010.

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres
(Coorientador)

Prof. José Domingos Guimarães
(Coorientador)

Prof. Eduardo Paulino da Costa

Prof. Antônio Bento Mâncio

Prof. Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Orientador)

Aos meus pais, Marco Aurélio e
Girlene, pelo incentivo e exemplo de
dedicação, humildade e caráter.

Aos meus irmãos, Bruno e Carolina,
pelo carinho e amizade.

Dedico

“Conhecer não é demonstrar nem explicar, é acender a visão.”

(Antoine de Saint-Exupéry)

“Pedras no caminho? Guardo todas um dia vou construir um castelo.”

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

A CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa. A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade.

Ao meu pai, Marco Aurélio de Oliveira, minha mãe, Girlene Galgani Reis de Oliveira e meus irmãos Bruno Reis de Oliveira e Carolina Reis de Oliveira por terem atuado como pilar durante esta jornada. Sem o incentivo e a força de vocês nada disso seria possível.

A professora da UNIVASF, Elenice Andrade Moraes, pela atenção dedicada à realização deste estudo. Sua ajuda foi imprescindível.

A Universidade de São Paulo (USP) em nome do professor Rubens Paes Arruda e seus orientados, pelo fornecimento da infraestrutura e apoio técnico necessários para realização da análise computadorizada do movimento espermático.

A todos os professores que tanto me ensinaram durante minha carreira acadêmica, em especial aos professores Giovanni Ribeiro de Carvalho e José Domingos Guimarães, pela oportunidade e pela amizade a mim dedicadas durante estes anos de estudo sobre a reprodução equina.

Aos membros da banca de defesa de tese, prof. Eduardo Paulino da Costa, prof. Ciro Alexandre Alves Torres e prof. Antônio Bento Mâncio.

A Lú por ser tão especial, valeu pela força e por me ajudar a ser uma pessoa melhor.

Aos meus grandes amigos dos tempos de graduação: Carioca, Emílio, Fred, Newton, Rafael Bichu, Renato e Thiagão, pelo companheirismo, pela dedicação e por trazerem sentido à palavra amizade.

Aos companheiros da pós-graduação: Nelcino, Goianin, Silvia, Madriano, Renata, Diogo, Júlio, Carol e Jura.

Aos membros do importante grupo de estudos em reprodução animal, GERA, do qual me sinto parte e com os quais tanto aprendi: Leo, Rogério, Morgana, Chico, Eric, Bruno, Bruna, João Gabriel e Grazi. Sempre contem comigo e saibam que conto com vocês.

Àqueles com quem estagiei e pude aprender a amar a profissão de veterinário de equinos: Guará, Chico, Helvécio, Edílson, Reno e Igor.

A todos avôs, tios, primos e amigos de Belo Horizonte com os quais sempre que necessário pude contar e que me mostraram que a distância não separa a força e o pensamento positivo das pessoas que desejam nosso bem.

Aos estagiários que tanto colaboraram durante o experimento e os momentos de descontração: Manú, Fernanda, Baiana, Luana, Luiza, Gisele, Paulo e Trocin.

Ao amigo Daniel Macedo Rates por atuar como braço direito durante a realização deste experimento, com quem pude contar incondicionalmente sempre de forma exemplar. Aos colegas de orientação Pedro Gama Ker e Guilherme Pugliesi pela disponibilidade, ajuda, força e amizade.

A todos os funcionários do departamento de Zootecnia em especial do setor de Equideocultura, agradeço em nome do Fernando e da Celeste.

Ao proprietário do haras Tarumã, Luiz Felipe Haddad por disponibilizar a estrutura e os animais para realização deste estudo.

Ao professor Joaquim Hernán Patarroyo e ao técnico Márcio pela disponibilidade de infra-estrutura e apoio durante as avaliações em microscopia de fluorescência.

Àqueles que injustamente eu tenha me esquecido, mas que foram importantes para esta conquista.

E em último lugar, porém não menos importante, aos equídeos que incentivaram e continuam a incentivar minha prazerosa busca pelo conhecimento.

BIOGRAFIA

RENAN REIS DE OLIVEIRA, filho de Marco Aurélio de Oliveira e Girlene Galgani Reis de Oliveira, nasceu na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, em 23 de março de 1985.

Em março de 2004, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2008, iniciou o programa de pós-graduação do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, concentrando seus estudos na área de Fisiologia da Reprodução Animal.

Em 23 de fevereiro de 2010, submeteu-se à defesa desta dissertação.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Morfologia espermática.....	5
2.2. A membrana plasmática.....	6
2.3. Princípios da criopreservação.....	8
2.4. Criopreservação de sêmen asinino.....	13
2.4.1. Coleta de sêmen.....	13
2.4.2. Centrifugação.....	14
2.4.3. Resfriamento.....	14
2.4.4. Congelamento.....	16
2.4.5. Descongelamento.....	17
2.5. Colesterol e a criopreservação espermática.....	18
2.6. Avaliação espermática.....	22
2.6.1. Morfologia espermática.....	22
2.6.2. Testes de integridade das membranas e viabilidade do espermatozóide.....	23
2.6.2.1. Coloração supravital.....	24
2.6.2.2. Teste hiposmótico.....	24
2.6.2.3. Testes com sondas fluorescentes.....	26
2.6.3. Avaliação da cinética espermática.....	28

2.6.3.1. Avaliação subjetiva da cinética espermática.....	28
2.6.3.2 Avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA – Computer-assisted semen analyses).....	28
2.6.4. Teste de termo resistênica (TTR).....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Local e período experimental.....	32
3.2. Animais e manejo dos mesmos.....	32
3.3. Coleta de sêmen.....	33
3.4. Preparo de soluções de ciclodextrina carregada com colesterol (CLC).....	33
3.5. Tratamento com CLC e processamento do sêmen.....	34
3.6. Congelamento do sêmen.....	34
3.7. Descongelamento do sêmen.....	35
3.8. Testes <i>in vitro</i> para avaliar a viabilidade espermática do sêmen congelado.....	35
3.8.1. Avaliação subjetiva do movimento espermático.....	35
3.8.2. Avaliação computadorizada do movimento espermático.....	35
3.8.3. Teste hiposmótico (HOST).....	36
3.8.4. Coloração supravital (vivos e mortos).....	36
3.8.5. Teste com sondas fluorescentes.....	36
3.8.6. Teste de termo resistênica.....	37
3.8.7. Morfologia espermática.....	37
3.9. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
7. ANEXOS.....	72
7.1. ANEXO A.....	72
7.2. ANEXO B - Análise estatística.....	77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Valores médios e desvios padrão das características físicas do sêmen fresco de jumentos da raça Pêga.....40
- Tabela 2 - Valores médios e desvios padrão dos percentuais das anormalidades espermáticas do sêmen fresco de jumentos da raça Pêga.....42
- Tabela 3 – Motilidade espermática total (MOT) e vigor espermático durante as diferentes etapas do processo de congelamento de sêmen de jumentos da raça Pêga para as diferentes concentrações de CLC (médias \pm desvios padrão).....42
- Tabela 4 – Médias e desvios padrão da avaliação da motilidade espermática total (MOT) e vigor espermático; e das alterações percentuais na morfologia espermática (Dma - defeitos maiores, Dme - defeitos menores, Dtot - defeitos totais) de espermatozóides descongelados de jumentos da raça Pêga após o tratamento com diferentes concentrações de colesterol incorporado a ciclodextrina (CLC).....44
- Tabela 5 - Médias e desvios padrão dos parâmetros MOT (motilidade total), PROG (motilidade progressiva), VAP (velocidade de trajeto), VCL (velocidade curvilínea), VSL (velocidade progressiva), ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça), BCF (frequência de batimento flagelar), STR (retilinearidade), LIN (linearidade) do sêmen asinino acrescido de diferentes concentrações de CLC.....45

Tabela 6 – Médias e desvios padrão dos percentuais de espermatozoides asininos criopreservados reativos aos testes hiposmótico (HOST) e supravital (SV), em função dos tratamentos com diferentes quantidades de CLC.....47

Tabela 7 – Médias e desvios padrão dos percentuais de espermatozoides criopreservados, após adição de diferentes concentrações de CLC, que apresentavam MIAI (membrana plasmática intacta e acrossoma intacto), MIAL (membrana plasmática intacta e acrossoma lesado), MLAI (membrana plasmática lesada e acrossoma intacto), MLAL (membrana plasmática lesada e acrossoma lesado) em teste com sondas fluorescentes do sêmen de jumentos raça Pêga.....48

Tabela 8 - Correlação Simples de Pearson entre a MOT (motilidade total – CASA), PROG (motilidade progressiva – CASA), HOST (células reativas ao teste hiposmótico, SV (células não coradas ao teste supravital) e MIAI (células com membrana intacta e acrossoma intacto por teste com sondas fluorescentes) do sêmen congelado/descongelado de jumentos da raça Pêga.....52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização da membrana plasmática, modelo “mosaico fluido”	6
Figura 2 - Representação esquemática das mudanças físicas sofridas pelo espermatozóide equino durante o congelamento e descongelamento.....	10
Figura 3: Canais não congelados.....	11
Figura 4: Caminhos utilizados no cálculo da velocidade da cabeça dos espermatozoides. O comprimento de cada caminho em questão é corrigido (distância/tempo) para dar a velocidade. Por exemplo, a distância percorrida ao longo do trajeto curvelinear dividido pelo tempo é a velocidade curvelinear (VCL), etc.....	30
Figura 5: Esquema simplificado do processamento do sêmen para criopreservação.....	38
Figura 6: Motilidade total em diferentes tempos do sêmen de jumentos descongelado e incubado a 37°C por 120 minutos, para os diferentes tratamentos com CLC ($P>0,05$).....	49
Figura 7: Vigor em diferentes tempos do sêmen de jumentos descongelado e incubado a 37°C por 120 minutos, para os diferentes tratamentos com CLC ($P>0,05$).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentual
°C	Graus celsius
ALH	Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
BCF	Freqüência de batimentos flagelares
Ca²⁺	Íon cálcio
CASA	Análise computadorizada do sêmen
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CLC	Colesterol incorporado a ciclodextrina
Dma	Defeitos espermáticos morfológicos maiores
Dme	Defeitos espermáticos morfológicos menores
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPBS	Solução salina tamponada de Dulbecco
Dtot	Defeitos morfológicos totais
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
g	Grama
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
hrs	Horas
Hz	Hertz
HOST	Teste hiposmótico
JC-1	5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3'tetraetil iodeto de benzimidazolicarbocyanina
L	Litros
µL	Microlitro
µm	Micrômetros

µg	Microgramas
MIAI	Membrana plasmática intacta, acrossoma intacto
MIAL	Membrana plasmática intacta, acrossoma lesado
MLAI	Membrana plasmática lesada, acrossoma intacto
MLAL	Membrana plasmática lesada, acrossoma lesado
mg	Miligrama
Mg²⁺	Íon magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mOsmI	Miliosmol
Na⁺	Íon sódio
NRC	National Research Council
P	Nível de significância
PNA	Aglutinina <i>Arachis hypogea</i>
PSA	Aglutinina <i>Pisum sativum</i>
pH	Concentração de íons hidrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAEG	Sistema de Análise Estatística da UFV
Sptzs	Espermatozóides
STR	Retilinearidade
SV	Coloração supra vital
TALP	Meio tyrode com albumina, lactato e piruvato
TTR	Teste de termo resistênica
UI	Unidades internacionais
VAP	Velocidade de trajeto
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade progressiva

RESUMO

OLIVEIRA, Renan Reis, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2010. **Efeito *in vitro* da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoides criopreservados de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga.** Orientador: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-orientadores: José Domingos Guimarães e Ciro Alexandre Alves Torres.

A criopreservação de sêmen asinino vem apresentando limitações na fertilidade que desestimulam sua utilização como rotina para profissionais que trabalham com a espécie. A incorporação de colesterol associado à ciclodextrina (CLC) tem se mostrado uma alternativa promissora por melhorar a resistência espermática ao processo de criopreservação em diversas espécies. Objetivou-se verificar os efeitos *in vitro* da adição de diferentes concentrações de CLC na viabilidade de espermatozoides criopreservados de jumentos da raça Pêga. Vinte e cinco ejaculados de cinco jumentos (cinco ejaculados por jumento) foram incubados a temperatura de laboratório por 15 minutos com diferentes concentrações de CLC: 0 mg (controle - CT), 1 mg (T1), 2 mg (T2) e 3 mg (T3) / 120×10^6 espermatozoides totais, antes do congelamento. As amostras foram descongeladas e avaliadas quanto à integridade física da membrana plasmática (SV), integridade funcional (HOST), morfologia espermática, longevidade (TTR) e viabilidade da membrana plasmática e do acrossoma (teste com sondas fluorescentes - IP/FITC-PNA). Os parâmetros físicos foram avaliados de forma subjetiva e objetiva (CASA). As amostras tratadas com CLC apresentaram maior integridade funcional e física ($P < 0,05$) da membrana plasmática que as amostras do tratamento CT. A inclusão de CLC resultou em um aumento ($P < 0,05$) nos valores de motilidade total e progressiva (CASA) para os três tratamentos quando comparado ao CT. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) na quantidade de células com a membrana plasmática e acrossoma intactos pelos testes de epifluorescência. Também não foi observada diferença entre os tratamentos durante o TTR para os parâmetros motilidade total e vigor espermático ($P > 0,05$). A

utilização de colesterol incorporado a ciclodextrina aumenta a resistência espermática aos processos de criopreservação, aumentando o número de células com motilidade e membrana íntegra. Novos estudos devem ser realizados para avaliar o efeito do CLC na fertilidade do sêmen asinino.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Renan Reis, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **In vitro effect of plasma membrane cholesterol incorporation to Pêga donkey (*Equus asinus*) cryopreserved spermatozoa.** Adviser: Giovanni Ribeiro de Carvalho. Co-advisers: José Domingos Guimarães and Ciro Alexandre Alves Torres.

The cryopreservation of donkey semen has shown limitations on fertility that discourages their use as routine for professionals working with this species. Incorporation of cholesterol-loaded cyclodextrin (CLC) has proved a promising alternative to improve the resistance of spermatozoa cryopreservation in several species. The aim of this study was to determine the effects of adding different CLC concentrations on in vitro viability of frozen-thawed Pêga donkey spermatozoa. Twenty-five ejaculates from five donkeys (five ejaculates per animal) were submitted to different concentrations of CLC: 0 mg (control), 1 mg (T1), 2 mg (T2) and 3 mg (T3) / 120×10^6 total spermatozoa for 15 minutes before freezing. Samples were thawed and evaluated for physical integrity of sperm plasma membrane (eosin-nigrosin), functional integrity (HOST), sperm morphology, longevity (TTR), and viability of sperm plasma membrane and acrosome (tested with fluorescent probes - IP/FITC-PNA). Physical parameters were measured by subjective and objective (CASA) evaluation. Treated groups had higher physical and functional integrity plasma membrane ($P < 0.05$) than control. Inclusion of CLC resulted either in higher total and progressive motile (CASA) ($P < 0,05$). There were no differences in the amount of cells with plasmas membrane and acrossome intact by epifluorescence test ($P > 0.05$). No difference was observed for total motility and vigor between treatments during TTR ($P > 0,05$). The use of cholesterol-loaded cyclodextrin increases the resistance of frozen-thawed process, number of cells with motility and viable membranes ($P < 0,05$). Futher studies should be conducted to evaluate the influence of CLC cryopreserved donkey spermatozoa fertility.

1- INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho equino do mundo com um número aproximado de 5,9 milhões de animais. Estima-se que além dos equinos, o rebanho equídeo nacional seja constituído por 1,3 milhão de muares e 1,2 milhão de asininos (CNA, 2006).

A fim de produzir animais que conciliem a rusticidade dos jumentos (*Equus asinus*) à estrutura física dos eqüinos (*Equus caballus*) diversos criadores têm optado pela produção do híbrido (muar). Muares vêm sendo cada vez mais valorizados por criadores e trabalhadores rurais que optam por animais mais resistentes para lida com gado nos sistemas extensivos de criação que predominam no Brasil. O jumento Pêga associa ao porte médio e a rusticidade, o andamento marchado que confere maior conforto ao equitador. Tais características associada à traços mais delicados fazem com que esta raça possua a maior associação de criadores de jumentos do país com mais de 7000 jumentos registrados e distribuídos em todas as regiões do Brasil (NUNES, 2007).

A importância econômica, cultural e social exercida pelos equídeos têm levado ao desenvolvimento de estudos que visam aprimorar a eficiência reprodutiva nestas espécies.

A inseminação artificial com sêmen congelado é uma importante biotecnologia da reprodução por apresentar uma série de vantagens, como: acelerar o ganho genético (por maximizar a utilização do macho), evitar a necessidade do transporte de animais (em muitos casos viabilizando a comercialização de material genético), propiciar o armazenamento do sêmen por longos períodos (garantindo ao proprietário um banco genético de animais que

venham a sofrer injúrias ou venham a óbito) e propiciar maior controle na disseminação de doenças sexualmente transmissíveis. No entanto, os resultados apresentados até o momento têm limitado a utilização desta biotecnologia nas espécies eqüina e, principalmente, na asinina, na proporção em que é exercida na espécie bovina.

O sucesso no processo de criopreservação de sêmen depende da qualidade do sêmen fresco, de sua interação com os meios diluidores, dos crioprotetores e da curva de resfriamento e descongelamento utilizados (PICKETT & AMANN, 1992). Além destes fatores existe uma maior susceptibilidade de algumas espécies a danos durante o processo de criopreservação. Esta diferença de susceptibilidade se deve em parte a composição de lipídeos na membrana plasmática, principalmente, a relação colesterol:fosfolipídio. Espécies com baixa (suínos e eqüídeos) intermediária (bovinos e ovinos) e alta (homem e camundongo) relação variam nesta mesma ordem à susceptibilidade ao choque térmico. Sabe-se que o colesterol presente na membrana plasmática dos espermatozóides tem a função de estabilizá-la, protegendo a célula durante o resfriamento (GRAHAM & FOOTE, 1987).

Perdas de colesterol da membrana plasmática de células criopreservadas têm sido observadas em suínos (50%) e garanhões (28%) (CEROLINI *et al.*, 2001; MOORE *et al.*, 2005). Esta perda de colesterol pode causar uma capacitação pré-matura destas células, reduzindo a viabilidade das mesmas nos órgãos reprodutivos da fêmea (WATSON, 1995). Uma maior concentração de colesterol na membrana pode impedir que as células sofram maturação precoce e capacitação, aumentando a sua viabilidade (MOORE *et al.*, 2005).

Estudos têm demonstrado efeitos benéficos da adição de colesterol na integridade da membrana plasmática e dos parâmetros físicos de espermatozóides criopreservados de garanhões (ZAHN *et al.*, 2002; MOORE *et al.*, 2005; AMORIM, 2008a; GRAZAR *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SPIZZIRI *et al.*, 2010), jumentos (ALVAREZ *et al.*, 2006), bovinos (PURDY & GRAHAM, 2004a, b; MOCÉ & GRAHAM, 2006; AMORIM *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2010), carneiros (MORRIER & BAILEY, 2005; MOCÉ *et al.*, 2010) e suínos (MAO *et al.*, 2005; GALANTINO-HOMER *et al.*, 2006; WALTERS *et al.*, 2008; MORAES *et al.*, 2009).

Realizou-se este estudo objetivando verificar os efeitos *in vitro* da adição de diferentes concentrações de colesterol à integridade e viabilidade da membrana plasmática, na longevidade, na morfologia e nos parâmetros físicos de espermatozóides criopreservados de jumentos da raça Pêga.

2- REVISÃO DE LITERATURA

Os equídeos exerceram um importante papel na formação econômica, social e política do Brasil. No aspecto econômico, desempenharam as funções de sela (para o vaqueiro e o peão, nas lidas comuns à pecuária); de carga (nos comboios ou comitivas); e, de tração (“motor” de veículos de carga e de moedas). No aspecto social – englobando exibicionismo, vaidade, orgulho e diferenciação social – desempenharam também seu papel tanto na função de sela quanto de tração dos veículos. A partir da segunda metade do século XIX, destacam-se no aspecto social, as atividades de esportes e lazer, como corrida e salto (CNA, 2006). Hoje estes animais continuam presentes no cotidiano de pessoas envolvidas no transporte de cargas, na lida com gado, no esporte e lazer, nas cavalarias do exército e da polícia e em clínicas envolvidas com a equoterapia.

Os asininos (*Equus asinus*), assim como os cavalos (*Equus caballus*), são membros da Família *Equidae*, e pertencem à ordem *Perissodactyla* (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Do cruzamento entre um eqüino que possui 64 cromossomos com um asinino que possui 62 cromossomos obtém-se um híbrido, muar ou bardoto, que geralmente possui 63 cromossomos e que geralmente é estéril (CHANDLEY, 1988).

Existem duas subespécies de asininos, *Equus asinus africanus* (jumento africano) e *Equus asinus europeus* (jumento europeu). O jumento Pêga possui provavelmente seu tronco étnico originário no jumento egípcio ou nubiano (*Equus asinus africanus africanus*), do qual muito se aproxima. Características como a

ocorrência de pelagem branca e sinais como estrela e extremidades brancas, não são observados nas outras variedades (*Equus asinus europeus* e *Equus asinus africanus*) que não do jumento egípcio (NUNES, 2007).

Com o intuito de aprimorar o ganho genético, possibilitar o armazenamento de sêmen de animais superiores e facilitar a comercialização deste material, recentemente, a Associação Brasileira de Criadores do Jumento Pêga (ABCJPêga) passou a permitir a utilização da criopreservação de sêmen. No entanto, os baixos resultados de fertilidade verificados até o momento na inseminação de éguas (VIEIRA *et al.*, 1985; ARRUDA *et al.*, 1986; PAPA *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2006; KER, 2009; VIDAMENT *et al.*, 2009) e principalmente, na utilização do sêmen congelado em jumentas (TRIMECHE *et al.*, 1998; OLIVEIRA, *et al.*, 2006; VIDAMENT *et al.*, 2009) têm limitado uma maior difusão desta biotecnologia.

2.1- Morfologia espermática

Espermatozoides são células haplóides especializadas que têm habilidade limitada para biossíntese e regeneração celular (AMANN & GRAHAM, 1993).

Estes gametas são alongados, constituídos de cabeça, colo e cauda. A cauda é a porção mais longa do espermatozoide que consiste da peça intermediária, peça principal e peça terminal (DOTT, 1975). A cabeça apresenta forma oval, é achatada e aloja o acrossoma, com suas enzimas hidrolíticas. O núcleo aloja a cromatina, altamente condensada a proteínas conhecidas como protaminas (BARTH & OKO, 1989). O colo é um curto segmento que liga o flagelo a cabeça do espermatozoide. A peça intermediária é envolta por uma bainha mitocondrial que envolve nove fibras densas associadas ao axonema (estrutura contrátil dos flagelos). Esta estrutura é formada por nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor de dois filamentos. As duas principais proteínas que participam da constituição do axonema são a tubulina e a dineína (ALBERTS, 2004). A peça principal da cauda é composta pelo axonema associado a fibras densas e a peça terminal da cauda é composta apenas pelo axonema (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O comprimento do espermatozóide é uma característica espécie específica, variando nos animais domésticos de 50 μm (varrão) a 90 μm (touro). As características morfológicas espermáticas são semelhantes para jumentos e garanhões, apesar do espermatozóide asinino possuir uma cauda um pouco mais longa e a cabeça ligeiramente mais globosa (NISHIKAWA *et al.*, 1952; MANN *et al.*, 1963).

2.2- A membrana plasmática

A membrana plasmática envolve o espermatozóide em sua totalidade. Esta membrana é formada basicamente por uma bicamada lipídica entremeada por proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios organizados em um “mosaico fluido” (Figura 1) (SINGER & NICHOLSON, 1972).

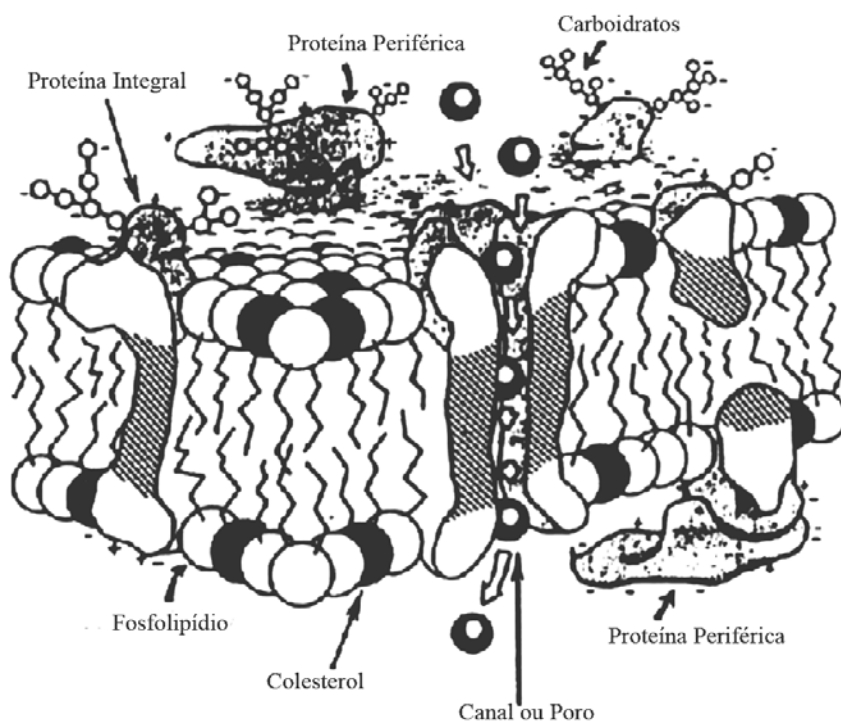


Figura 1: Organização da membrana plasmática, modelo “mosaico fluido” (ZAFIAN, 1984).

A composição básica da bicamada lipídica é de 65 a 70% de fosfolípidios, sendo o ácido docosahexanóico o principal ácido graxo ligado a estes fosfolípidios (HOLT, 2000). As diferenças no comprimento e na saturação da cauda de ácidos graxos são importantes, pois influenciam na habilidade das moléculas de

fosfolipídios em se agrupar, afetando, conseqüentemente, a fluidez da membrana (ALBERTS *et al.*, 2004).

Quanto maior a proporção dos ácidos graxos saturados, maior é a temperatura de transição sólido-fluida da membrana (NELSON & COX, 2000). Os lipídios predominantes na membrana plasmática são representados pelos fosfolipídios, colesterol, esfingolipídios e gangliosídeos (AMANN & PICKETT, 1987).

Durante a maturação epididimária ocorrem modificações na composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides que têm como objetivos: promover a estabilização da membrana dos espermatozoides para seu armazenamento no epidídimo e seu transporte nos tratos reprodutivos do macho e da fêmea, além de fornecer ao espermatozoide a capacidade fecundante por meio do estabelecimento da organização molecular necessária à capacitação e fertilização, no momento que entrarem em contato com os fluidos do sistema reprodutivo da fêmea (PARKS & HAMMERSTEDT, 1985).

As proteínas representam cerca de 50% do peso da membrana sendo que as duas classes, integrais e periféricas, possuem funções distintas. As proteínas integrais atuam como poros, ou, canais iônicos e as periféricas na estabilização da membrana (LEHNINGER *et al.*, 2006).

Na membrana estão presentes regiões que se dividem em interações entre lipídios e proteínas conhecidas como domínios de membrana. Estes domínios podem ser mais bem subdivididos em região acrossomal e pós acrossomal (HAFEZ & HAFEZ, 2004). A manutenção dos domínios de membrana é importante para que ocorram os eventos altamente específicos de manutenção das funções espermáticas, como, principalmente, a capacitação, reação acrossomal e fecundação (PARKS & GRAHAM, 1992).

A membrana não é estática. Geralmente todos os componentes estão dispostos aleatoriamente e são livres para movimentarem-se lateralmente. Isso porque a membrana é fluida a temperatura ambiente, denominado estado líquido-cristalino (PARKS & GRAHAM, 1992). A proporção colesterol : fosfolipídios, assim como a natureza dos fosfolipídios e a temperatura, determinam a fluidez da membrana. Em geral, quanto mais colesterol, menos fluida é a membrana (AMANN & GRAHAM, 1993).

À medida que a temperatura das células diminui (19°C a 5°C), durante o processo de resfriamento que antecede o congelamento, a membrana passa por uma fase de transito do estado fluido para o estado líquido-cristalino (AMANN & PICKETT, 1987). Com isso, as proteínas podem vir a se agregar ao longo da membrana, fato que acarreta um aumento em sua permeabilidade e uma redução na atividade metabólica dos espermatozóides. Os danos desta fase de transição são geralmente irreversíveis e são coletivamente conhecidos como choque térmico (HOLT & NORTH, 1984; AMANN & GRAHAM, 1993). As principais alterações observadas em espermatozóides que sofreram choque térmico são: aumento do movimento circular fechado, perda acelerada da motilidade, danos na membrana plasmática e acrossomal, decréscimo na produção de energia, perda de moléculas e íons (GRAHAM, 1996; DAVIES MOREL, 1999).

Em geral, a criopreservação provoca lesões à membrana celular, principalmente, devido a alterações térmicas, mecânicas, químicas e ao estresse osmótico. Os prejuízos sofridos pela membrana plasmática no processo de criopreservação são atribuídos à desidratação celular e formação de cristais de gelo (PARKS & GRAHAM, 1992).

2.3- Princípios da criopreservação

O processo de criopreservação de sêmen inclui todas as etapas – desde a coleta de sêmen, diluição, centrifugação, resfriamento e congelamento – até a manutenção da capacidade funcional do espermatozóide por determinado período após o descongelamento (WATSON, 1995). O sucesso no resultado final do processo de criopreservação depende de interações entre meios diluidores, crioprotetores, curva de resfriamento e descongelamento. Agindo em conjunto, estas etapas, são responsáveis por reduzir os danos causados pelo choque térmico, reduzindo a formação de cristais de gelo intercelulares e propiciando uma adequada desidratação celular (HOLT, 2000).

Existem pelo menos dois pontos de estresse pelos quais as células espermáticas passam durante o congelamento e descongelamento. O primeiro está relacionado aos efeitos das mudanças na temperatura e o segundo aparece por causa da formação e dissolução do gelo (WATSON, 1995).

Um fenômeno lesivo ao espermatozóide ocorre durante o resfriamento. À medida que a temperatura é reduzida abaixo de 0°C, começa a ocorrer cristalização do gelo no meio extracelular. Se há um congelamento muito lento, as células são expostas por muito tempo aos chamados “efeitos de solução”. Este efeito inclui todas as características de mudanças da solução extracelular como: a cristalização do gelo, a concentração de sal com elevação da osmolaridade, a alteração do pH, as alterações na composição das soluções em consequência dos sais atingirem seu ponto de saturação e cristalização, além de todas as implicações celulares desses eventos (SENGER, 1986; WATSON, 1995).

Outro fenômeno observado é a formação de cristais de gelo no interior das células espermáticas que ocorre principalmente quando são usadas taxas de resfriamento excessivamente rápidas (SENGER, 1986). Em taxas mais altas que as ideais, não há tempo suficiente para que a água saia das células, levando a um super-resfriamento e a uma crescente probabilidade da nucleação do gelo intracelular, que pode ser letal. (DUNCAN & WATSON, 1992; WATSON, 1995).

A curva de descongelamento ideal depende da curva de congelamento utilizada. Espermatozóides congelados numa curva lenta requerem uma curva lenta de descongelamento, para permitir o descongelamento dos cristais de gelo extracelulares. O descongelamento desses cristais provoca a diluição dos solutos ocorrendo lentamente a rehidratação das células. Caso os espermatozóides sejam descongelados rapidamente, os cristais extracelulares descongelam mais rápidos e a água penetra nas células de forma brusca, causando ingurgitamento e danos à membrana plasmática (AMANN & PICKETT, 1987; HOLT, 2000). As células congeladas numa curva rápida necessitam de uma curva rápida de descongelamento, de modo que o gelo intracelular que se formou durante o congelamento não tenha tempo para se recrystalizar (Figura 2) (PICKETT & AMANN, 1992; GRAHAM, 1996; SQUIRES *et al.*, 1999).

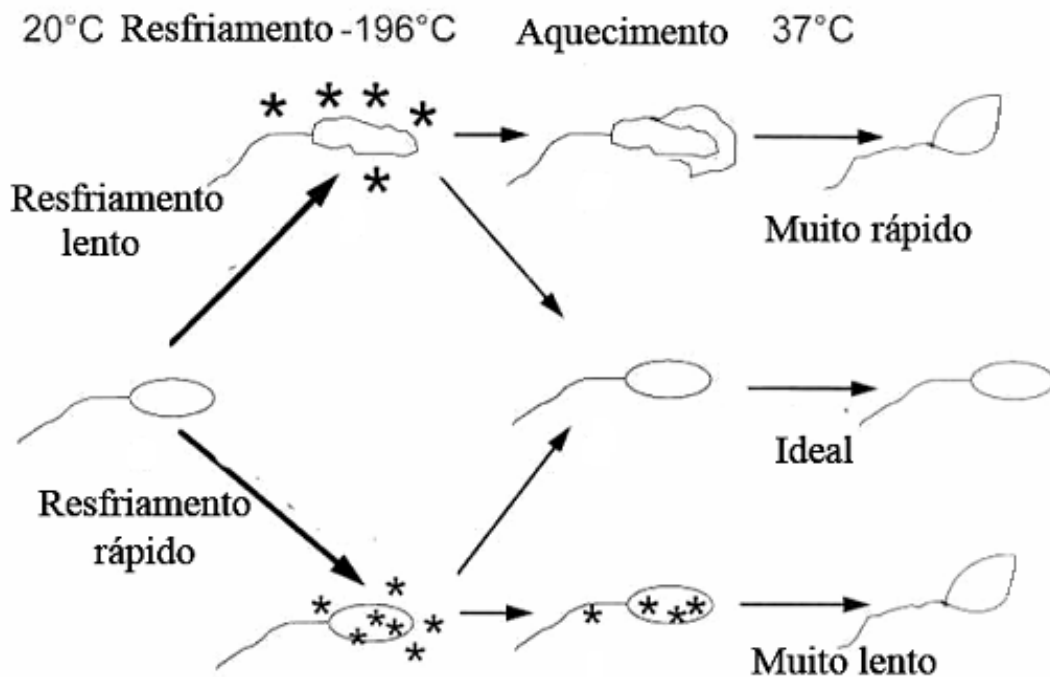


Figura 2: Representação esquemática das mudanças físicas sofridas pelo espermatozóide eqüino durante o congelamento e descongelamento (AMANN & PICKETT, 1987).

Quando a temperatura do meio atinge entre -5°C e -10°C , cristais de gelo se formam, a partir da água pura no meio extracelular, porém protegido pela membrana plasmática, o meio intracelular não se congela, (super refrigerado). Segundo MAZUR (1984), o ponto de congelamento de uma solução é determinado pela concentração de solutos que dela participa. Em decorrência, a água do interior da célula flui por osmose para o meio externo e também se congela. Os outros elementos do meio extracelular (sais, proteínas e gorduras), permanecem na porção não congelada (AMMAN & GRAHAM, 1993; HOLT, 2000). Com a temperatura diminuindo, mais moléculas de água se cristalizam, resultando em uma concentração maior de solutos na fração não congelada, que formarão os “canais não congelados” (Figura 3) (SQUIRES *et al.* 1999). MAZUR (1984) verificou que ao congelar os espermatozoides em nitrogênio líquido (-196°C), estes residem em canais de solução não congelados. Sendo que AMANN & PICKETT (1987) afirmam que somente as células localizadas neste local sobreviverão ao processo da criopreservação.

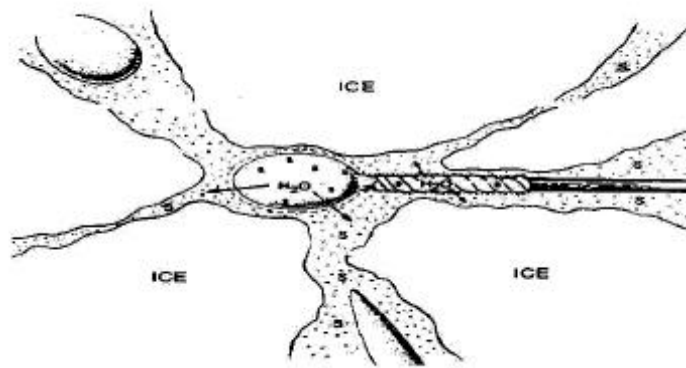


Figura 3: Canais não congelados (SQUIRES, 1999).

Após atingir a temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ as células cessam suas reações e atividades metabólicas, tornando-se dormentes. Nesta faixa de temperatura a viabilidade não é mais alterada, independente do tempo de armazenamento (MAZUR, 1980).

Diferentes teorias da crioinjúria divergem em apontar se a injúria ocorre durante o resfriamento ou o aquecimento do espermatozóide. Há alguma evidência para sugerir que células congeladas sejam danificadas pelo reaquecimento, o que tem sido considerado devido ao fenômeno chamado de recristalização de cristais. Este fenômeno consiste na transformação de vários cristais microscópicos de gelo em cristais de gelo maiores, que são reconhecidos como prejudiciais (WATSON, 1995). Lesões de membrana causadas por transições da fase lipídica talvez possam também ser responsáveis por este efeito negativo do aquecimento, uma vez que passar pelo processo de resfriamento e reaquecimento significa atravessar pontos de transição de fase por duas vezes (HOLT *et al.*, 1992).

Para que a criopreservação tenha sucesso, é necessário que o espermatozóide seja colocado em um ambiente apropriado (diluidor), que minimize os danos às membranas, e não acione prematuramente os mecanismos de capacitação espermática e reação acrossômica (LOOMIS, 2005). Com esse intuito têm se produzido meios diluidores adicionados de uma série de crioprotetores.

Segundo KEITH (1998), um bom crioprotetor deve possuir baixo peso molecular, com alta solubilidade em água e baixa toxicidade celular. Observando a literatura é possível encontrar uma divisão básica que agrega os crioprotetores em penetrantes e não penetrantes.

ASHWOOD-SMITH (1987) subdividiu uma série de compostos penetrantes, da família dos álcoois (etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol, polietilenoglicol, e propilenoglicol), das amidas (acetamida, formamida, lactamida entre outras) e o dimetil sulfóxido (DMSO) com características crioprotetoras. O glicerol é atualmente o principal crioprotetor penetrante utilizado apesar de seus efeitos deletérios, como: estresse osmótico, mudanças na organização, fluidez e permeabilidade da membrana, e na sua composição lipídica (WATSON, 1995). Ainda hoje, o mecanismo de ação dos crioprotetores penetrantes não está bem compreendido, sugere-se (WATSON, 1981) que estas substâncias atuem por meio de propriedade coligativa com a água reduzindo o ponto de congelação da solução. Estes compostos modificam as características da molécula de água, reduzindo a formação de cristais de gelo, atuando como solvente e diminuindo a concentração de solutos no meio externo. A presença do glicerol em uma solução irá propiciar uma maior quantidade de água não congelada do que outra sem o glicerol, aumentando o volume dos canais de solventes não congelados e reduzindo a concentração de sais das porções não congeladas (MAZUR, 1980; DALIMATA *et al.*, 1997). Além disto, estas substâncias atuam na membrana celular estabilizando o complexo: água, lipídeo e proteína (ROWE, 1966).

Entre os crioprotetores não penetrantes estão os açúcares (lactose, frutose, rafinose e threalose), os polímeros sintéticos (metil celulose), a gema de ovo, o leite e alguns aminoácidos (glutamina, treonina, glicina, dentre outros). Esta categoria protege as células basicamente por meio de efeitos osmóticos. As células em suspensão em um meio hipertônico perdem seu conteúdo de água. Desta forma, diminuem a possibilidade de formação de cristais dentro da célula. Estes componentes agem como solutos ou colóides, não servindo como solventes (GRAHAM, 1998).

2.4- Criopreservação de sêmen asinino

Devido às semelhanças existentes entre as características seminais de jumentos e garanhões, têm-se utilizado das metodologias existentes para eqüinos para criopreservar espermatozóides asininos.

2.4.1- Coleta de sêmen

Para a realização de coleta de sêmen, ou, a cobertura em éguas, o jumento deve ser condicionado (KREUCHAUF, 1984). Além da necessidade do acondicionamento, existem grandes diferenças na manifestação de receptividade sexual de éguas e jumentas e talvez este fato seja responsável por alguns insucessos obtidos no acasalamento e coletas de sêmen utilizando éguas como manequim (MORAIS *et al.*, 1993, TIBARY, 2007).

Diversos estudos foram desenvolvidos envolvendo a coleta de sêmen em jumentos (HENRY *et al.*, 1987; MORAIS, 1990; COSTA, 1991; GASTAL, 1991; GEBERS, 1995; CANISSO *et al.*, 2010), estas são realizadas de forma semelhante às coletas realizadas para garanhões, com uso dos diversos modelos de vaginas artificiais disponíveis para equinos, preenchida com água aquecida entre 42 e 50 °C.

Uma característica peculiar à espécie asinina é a necessidade de um tempo maior de preparação para cobertura/coleta que outras espécies (MORAIS, 1990, GASTAL, 1991, COSTA, 1991; GERBERS, 1995; TIBARY, 2007). Isso se dá devido ao maior tempo de reação desta espécie. Tempo de reação é o período entre a exposição do macho a uma fêmea em cio até a realização da monta com ereção (SILVA FILHO *et al.*, 1999). Para jumentos de várias raças, independente do tipo de manequim empregado, longos tempos de reação vêm sendo observados, em média de 10 a 50 minutos (KREUCHAUF, 1984; HENRY *et al.*, 1987; MORAIS, 1990, GASTAL, 1991, COSTA, 1991; GERBERS, 1995; TIBARY, 2007).

2.4.2 Centrifugação

A centrifugação realizada durante a criopreservação do sêmen de eqüídeos tem como objetivo reduzir o percentual do plasma seminal e aumentar a concentração espermática. Em eqüinos tem se demonstrado que a presença do plasma seminal em grande quantidade tem efeito nocivo aos espermatozóides, como a redução da motilidade espermática (LOVE *et al.*, 2002; AURICH, 2008).

Na maior parte dos estudos com a criopreservação de sêmen asinino, a centrifugação é antecedida da diluição do sêmen na proporção 1:1 com um meio diluidor (SERRES *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; CANISSO, 2008a; FLORES *et al.*, 2008; KER, 2010). A maior parte dos diluidores utilizados na centrifugação de sêmen asinino são aqueles utilizados para o resfriamento de sêmen equídeo, principalmente, a base de leite em pó desnatado (OLIVEIRA, *et al.*, 2006; CANISSO, 2008a; KER, 2010). No entanto, outros diluidores utilizados para garanhões, podem vir a ser utilizados para jumentos, dentre eles: solução de sacarose 11% (PIAO *et al.*, 1988), solução de glicose EDTA (MARTIM *et al.*, 1979), solução de Ringer com lactato (PAPA *et al.*, 1981), Stallion TALP media (MOORE *et al.*, 2005), dentre outros.

Para criopreservação de sêmen asinino têm se utilizado a força centrífuga relativa (400-660 g) e os tempos de centrifugação (7-20 min.) recomendados para eqüinos (SERRES *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006; CANISSO, 2008; FLORES *et al.*, 2008; KER, 2010). Com uma menor força centrífuga e um tempo adequado, os danos induzidos pelo processo de centrifugação, como a peroxidação lipídica, podem ser reduzidos (PARINAUD *et al.*, 1997).

2.4.3- Resfriamento

A manutenção de espermatozóides à temperatura de -196 °C, por si só não impede a viabilidade espermática, os principais danos sofridos pelas células ocorrem durante os processos de resfriamento e descongelamento (AMANN & PICKETT, 1987).

Uma curva de resfriamento inadequada imposta ao sêmen é responsável por elevar o número de lesões celulares, principalmente devido a alterações na propriedade física das membranas espermáticas (WATSON, 1981).

O resfriamento do sêmen inicia-se logo após a coleta, quando o sêmen é resfriado da temperatura corporal (37°C) a temperatura do ambiente de manipulação. Poucos danos são observados aos espermatozoides nesta fase, quando estes se encontram diluídos em meio adequado (KEITH, 1998). Tal fato foi ilustrado por KAYSER *et al.* (1992) que demonstraram que o sêmen poderia ser resfriado inclusive em taxas rápidas sem prejuízos para motilidade entre as temperaturas de 37°C e 20°C. Contudo, na faixa entre 19°C e 8°C, as células se apresentaram mais susceptíveis aos danos induzidos pelo resfriamento. Nesta fase, uma taxa de resfriamento de -0,05 a -0,5°C pode aumentar a motilidade pós resfriamento (MORAN, 1992; WATSON, 1995; GRAHAM, 1996; FÜRST, 2005).

DOUGLAS-HAMILTON *et al.* (1984), avaliando diferentes taxas de resfriamento agrupadas dentro de três categorias: lentas (<0,33°C/min); médias (0,33°C/min a 1,0 °C/min) e rápidas (>1,0 °C/min), observaram que as taxas lentas e rápidas causam maiores danos à célula espermática que a taxa média. Uma taxa de resfriamento intermediária pode ser benéfica no sentido de diminuir, de forma rápida e ordenada, o metabolismo celular do espermatozoide, mantendo, com isso, as reservas energéticas dos mesmos, por maior tempo, sem prejudicar a integridade morfofuncional da membrana plasmática, uma vez que o resfriamento repentino e desordenado induz ao choque térmico.

Estudos têm demonstrado o efeito benéfico do resfriamento, até 4-5 °C, antes do congelamento de sêmen equino (VIDAMENT *et al.*, 1997; FÜRST *et al.*, 2005).

FÜRST (2002) desenvolveu um sistema de resfriamento artesanal no qual o sêmen de garanhões foi resfriado de 22 °C a 8 °C, durante 35 minutos, proporcionando uma taxa média de queda de -0,5°C/min. O sêmen então permaneceu por 25 minutos em geladeira para estabilização prévia ao início do congelamento. Esta curva foi utilizada para sêmen de garanhões da raça Bretão e Mangalarga Marchador, e para jumentos, apresentando bons resultados de fertilidade em éguas inseminadas até seis horas após a ovulação (FÜRST, 2006; CANISSO, 2008a; KER, 2010).

2.4.4- Congelamento

A curva de congelamento é de extrema importância na manutenção da integridade celular. Quando a taxa de congelamento é adequada, a célula torna-se progressivamente desidratada e permanece funcional após o descongelamento.

Com a redução da temperatura, inicia-se a formação de cristais de gelo no meio extracelular, com isso, começa a acumular soluto neste compartimento que por osmose atrai mais água intracelular, desidratando o espermatozóide (MAZUR, 1984). No congelamento lento (-25 a -40°C/min.), o espermatozóide se desidrata devido à alta concentração de solutos no meio extracelular. Consequentemente, não se formam grandes cristais de gelo intracelulares (AMANN & PICKETT, 1987). Devido a maior concentração de soluto, as células espermáticas podem sofrer o efeito solução que é prejudicial à célula (WATSON, 1995). Por outro lado, numa curva de congelamento muito rápida (> -60°C/min.), a água não tem tempo de sair da célula e, em algum ponto abaixo de -10°C, esta congelará com a formação de grandes cristais de gelo. Cristais maiores podem causar danos mecânicos à célula, sendo uma das principais causas de morte celular durante o congelamento (GRAHAM, 1992).

A curva ideal de congelamento vai depender do tipo e da concentração do crioprotetor utilizado. Dado a grande variação de constituição dos meios de congelamento, não foi ainda definida uma taxa de congelamento padrão (HEITLAND *et al.*, 1995).

Os danos sofridos pelo espermatozóide durante o congelamento e o descongelamento ocorrem na faixa de temperatura entre -15 e -60°C (PARKS & GRAHAM, 1992).

Na criopreservação de sêmen asinino tem predominado curvas rápidas de congelamento (CANISSO, 2008a; VIDAMENT *et al.*, 2009; KER, 2010), geralmente ocorrendo a 4 cm do nitrogênio líquido. No entanto, curvas mais lentas também podem ser utilizadas (TRIMECHE *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

2.4.5- Descongelamento

A curva de descongelamento depende da curva de congelamento. Quando o congelamento é realizado com curva muito rápida, necessita-se para o descongelamento, de uma velocidade 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 rehidratação espermática, para que a célula não perca a sua viabilidade morfofuncional (MAZUR, 1984; HOLT, 2000).

Outros fatores como o tipo de envase, espessura da parede da palheta e condutividade de calor podem afetar o descongelamento (AMANN & PICKETT; 1987).

Dentre os principais métodos propostos para ganhões e que vêm sendo utilizados para jumentos no descongelamento de palhetas de 0,5 mL estão: o descongelamento rápido (75°C / 7") e o lento (37°C / 30"). VIDAMENT *et al.* (2002), ao estudarem a motilidade espermática do sêmen descongelado de ganhões 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. O método de descongelamento lento apresenta como vantagens a facilidade e menor probabilidade de erros ao descongelamento, além de maior agilidade no descongelamento de múltiplas palhetas (SAMPER *et al.*, 2007).

2.5- Colesterol e a criopreservação espermática

A composição em colesterol da membrana plasmática, assim como de outros constituintes, apresenta distribuição não uniforme. Espermatozóides bovinos, ovinos e de cobaias apresentam à região apical da membrana plasmática com aproximadamente quatro vezes mais colesterol do que a região pós acrossomal (HOLT & NORTH, 1984). Apesar da capacidade do colesterol de se deslocar entre as membranas, a manutenção das proporções de distribuição pode ser explicada por dois mecanismos: o primeiro seria devido a um equilíbrio

termodinâmico com os outros constituintes da membrana (LANGE *et al.*, 2004); o segundo pelo fluxo contínuo e organizado entre o local de síntese do colesterol (fígado, intestino, córtex da adrenal e gônadas) e os diferentes domínios da membrana (YEAGLE, 1985).

Pesquisadores observaram que bactérias que possuíam baixo teor de colesterol nas membranas celulares apresentavam pequena tolerância a baixas temperaturas (ROTTEM *et al.*, 1973). A partir deste fato, a quantidade de colesterol nas membranas dos espermatozóides passou a ser relacionada com sua susceptibilidade ao choque térmico (WHITE, 1993). Hoje, a relação entre níveis de colesterol da membrana plasmática dos espermatozóides e susceptibilidade ao choque térmico está bem estabelecida. Espécies que possuem altas proporções de colesterol em relação aos fosfolipídios, a exemplo dos humanos (0,83), são mais resistentes ao choque térmico (MESEGUER *et al.*, 2004; MOCÉ & GRAHAM, 2006). Por outro lado, espécies com menor proporção de colesterol:fosfolipídio, como, suínos (0,20) e equinos (0,36), são menos resistentes (CROSS, 1998).

Espermatozóides oriundos do testículo e da cabeça do epidídimo de carneiros são pouco afetados pelo choque térmico enquanto que aqueles da cauda do epidídimo e da ampola são muito mais susceptíveis (QUINN & WHITE, 1967). A perda de fosfolipídios e colesterol pelo espermatozóide durante o trajeto pelo trato reprodutivo do macho pode ser responsabilizada pelo aumento na susceptibilidade ao choque térmico (QUINN & WHITE, 1967).

O colesterol presente na membrana espermática apresenta uma importante função de estabilização das membranas. A remoção deste lipídeo da membrana promove sua desestabilização e, conseqüentemente, a reorganização dos componentes da bicamada, incluindo redistribuição de proteínas integrais (AMANN & GRAHAM, 1992; GADELLA *et al.*, 2001) e aumento da capacidade de fusão (CROSS, 1998).

Os exatos mecanismos pelos quais os lipídeos, como o colesterol, conferem proteção às membranas espermáticas não é conhecido (MOCÉ & GRAHAM, 2006). Sabe-se que o colesterol é responsável pelo aumento da fluidez da membrana quando esta é resfriada a temperaturas abaixo da fase de transição (ROTTEM *et al.*, 1973; CULLIS & HOPE, 1985). Portanto, a adição de colesterol pode ajudar a minimizar ou eliminar a fase de transição durante o processo de

resfriamento (GRAHAM & FOOTE, 1987). A maior estabilidade da membrana espermática propiciada pelo colesterol pode ter um papel ainda mais importante nas células em que há uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados (WHITE, 1993).

Devido a estes efeitos benéficos da ação do colesterol, foi sugerido que a inclusão de colesterol, ou, lipossomas contendo colesterol ao meio diluidor poderia aumentar a viabilidade e a longevidade dos espermatozóides, por aumentar o conteúdo de colesterol incorporado à membrana espermática (WHITE, 1993; CROSS, 1998). Os resultados relativos à utilização de lipossomas para proteção de espermatozóides são variados. Alguns estudos com ovinos (HOLT & NORTH, 1986), bovinos (GRAHAM & FOOTE, 1987), varrões (BUTLER & ROBERTS, 1975) e garanhões (HEITLAND *et al.*, 1995) demonstraram resultados positivos para motilidade e/ou redução das lesões de membrana e/ou até mesmo aumento na fertilidade. No entanto, outros estudos não relataram tais resultados (HOLT & NORTH, 1988; WILHELM, *et al.*, 1996; DENNISTON *et al.*, 1997).

Outra maneira de incorporar o colesterol à membrana de espermatozóides é por meio do complexo de inclusão com ciclodextrinas. Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, compostos de unidades glicosídicas, produtos da degradação do amido, que são capazes de incorporar várias substâncias sem a formação de ligações covalentes no centro do círculo que compõe sua estrutura (CHALLA *et al.*, 2005). Desta forma, o colesterol pode ser colocado em um formato que permite prontamente a sua incorporação à membrana plasmática do espermatozóide. As ciclodextrinas mostram-se um preciso e conveniente método para alterar o conteúdo de colesterol da célula (OHVO *et al.*, 1997; ATGER *et al.*, 1997). Complexos de drogas e ciclodextrina foram usados durante anos na indústria química que utiliza as ciclodextrinas como uma droga veículo, pois são amorfas, têm boa solubilidade, são atóxicas, e capazes de formar inclusão de complexos cristalinos com drogas (PITHA *et al.*, 1988).

Para síntese de complexos com substâncias hidrossolúveis, estes podem ser dissolvidos com a ciclodextrina diretamente em soluções aquosas. Já para substâncias insolúveis deve-se utilizar éter, clorofórmio, benzeno ou algum outro solvente orgânico (SAENGER, 1980; HU *et al.*, 2005).

As formas mais comuns de ciclodextrina produzidas possuem 6, 7, ou 8 unidades glicosídicas, designadas respectivamente de α , β e γ ciclodextrinas (SAENGER, 1980). A extremidade externa da β -ciclodextrina é hidrofílica, sendo, portanto, solúvel em água. A extremidade interna do anel é hidrofóbica. As propriedades hidrofóbicas permitem as ciclodextrinas encapsularem compostos insolúveis (moléculas naturais e sintéticas como hormônios, vitaminas e compostos lipídicos) (CHALA *et al.*, 2005), que se tornam solúveis em soluções aquosas. β -ciclodextrinas têm maior afinidade, das três formas citadas, por compostos lipídicos, especialmente o colesterol (YANCEY *et al.*, 1996; OHVO *et al.*, 1997; CHRISTIAN *et al.*, 1997; CHOI & TOYODA, 1998; CROSS, 1999).

Existem também ciclodextrinas modificadas, sintetizadas a partir da α , β e γ ciclodextrinas, por meio da substituição dos grupos hidroxila por grupos hidroxipropila, metila e sulfobutila. Essas modificações melhoram sua solubilidade, reduzem sua toxicidade e aprimoram sua habilidade de dissolver esteróides em solução aquosa (CHALLA *et al.*, 2005). O colesterol incorporado a metil- β -ciclodextrina mantém maior o percentual de espermatozóides móveis e viáveis após a criopreservação quando comparado a células não tratadas com CLC, ou, tratadas com outros tipos de ciclodextrinas (α , α -hidrato, β , β -hidrato cyclodextrina) (COMBES *et al.*, 1998; GRAHAM, 1998; PURDY & GRAHAM, 2004).

Quando em incubação com células em cultura, sem a adição do colesterol, a ciclodextrina transfere o colesterol abaixo de gradiente de concentração, da membrana plasmática da célula para dentro da sua região hidrofóbica. Esta retirada de colesterol causa alterações da estrutura e funcionalidade da membrana (OHVO *et al.*, 1997; ATGER *et al.*, 1997). Quando ciclodextrinas são incubadas com espermatozóides, elas medeiam a remoção de colesterol que induz capacitação espermática (CHOI & TOYODA, 1998; CROSS, 1999; VISCONTI *et al.*, 1999). Alternativamente, se as mesmas são carregadas com colesterol, as ciclodextrinas transferem colesterol abaixo de gradiente de concentração para a membrana plasmática do espermatozóide, resultando num aumento dos níveis de colesterol na membrana (KLEIN *et al.*, 1995; PURDY & GRAHAM, 2004; MOORE *et al.*, 2005).

A associação da ciclodextrinas com as diversas espécies químicas é conhecida como compostos de inclusão. A água parece ter papel importante na

formação destes compostos. Quando em solução, as moléculas de águas presentes na cavidade das ciclodextrinas estão em um estado de alta energia e baixa entropia. Na presença de um terceiro componente, cuja polaridade seja menor que da água, ocorre a formação de complexos supramoleculares, através da entrada de moléculas, ou, grupos funcionais de moléculas na cavidade da ciclodextrina, com subsequente exclusão das moléculas de água ali presentes (SAENGER, 1980).

Um aspecto muito importante na utilização de CLC é que a incubação com espermatozoides deve ocorrer em um meio livre de lipídeos. Ao relatar estudos preliminares (não publicados) PURDY & GRAHAM (2004) citam que quando a incubação foi realizada em meio contendo gema de ovo, não foram observados efeitos benéficos para criopreservação espermática. Segundo os mesmos autores, nestes casos de incubação em meios contendo a gema de ovo, grande parte de colesterol incorporado a ciclodextrina, provavelmente, foi transferido para as gotas de lipídeo da gema de ovo.

Estudos recentes têm demonstrado efeitos benéficos da utilização do complexo CLC na criopreservação de sêmen de caprinos, bovinos, suínos, ovinos e equinos, com melhora nos parâmetros de motilidade (BARRERA-COMPEAN *et al.*, 2005), viabilidade espermática (COMBES *et al.*, 2000; MOCÉ & GRAHAM, 2006; GALANTINO-HOMMER *et al.*, 2006; AMORIM *et al.*, 2009) e reação acrossômica (MAO, *et al.*, 2005).

Alguns estudos demonstram que o conteúdo elevado de colesterol pode ser prejudicial ao espermatozoide (PARKS *et al.*, 1981), por induzir um estado de decapacitação, inibindo a reação acrossômica (DAVIS, 1978). No entanto, quando em níveis adequados o CLC não apresentou prejuízos a reação acrossômica e a fertilidade. Sendo benéfico por aumentar o número de espermatozoides que sobreviveram ao processo de criopreservação (PURDY & GRAHAM, 2004).

No único estudo avaliando o efeito do colesterol na criopreservação de sêmen de jumentos Zamorano-Leonés, ALVAREZ *et al.* (2006), testaram quatro concentrações: 0 mg (controle), 1,5 mg, 2 mg, 2,5 mg, e 3 mg de CLC / 120×10^6 espermatozoides. Melhores resultados para motilidade total e progressiva foram observados entre 1,5 e 2,5 mg. Maior percentual de células vivas e com acrossoma intacto foi observado para os tratamentos 2 e 2,5 mg. Com isso,

concluiu-se que a concentração ideal para espermatozóides asininos é de 2 mg de CLC / 120 x 10⁶ espermatozóides.

2.6- Avaliação espermática

A qualidade do sêmen e sua relação com fertilidade têm grande importância na produção animal. Testes laboratoriais são realizados para determinar a qualidade do sêmen para a sua aprovação e utilização em inseminações artificiais, o que torna de fundamental importância uma análise precisa (PERIS *et al.*, 2004).

Experimentalmente têm se buscado testes que correlacionem os resultados de análises laboratoriais com a fertilidade de amostras de sêmen. Além da vantagem destas análises fornecerem uma informação pontual sobre a qualidade seminal, muitas vezes, elas viabilizam a prática de experimentos com um número maior de tratamentos, reduzindo substancialmente os investimentos necessários na experimentação animal. Apesar dos avanços atuais, não foi desenvolvido um único teste *in vitro* que forneça informações sobre o potencial de fertilidade do sêmen, seja, fresco, resfriado, ou, congelado. Desta forma, tem-se optado por realizar juntamente a avaliação andrológica de rotina e na pesquisa um conjunto de testes complementares.

2.6.1- Morfologia espermática

O ejaculado pode conter uma série de espermatozóides anormais porém, se a proporção é alta, esse sêmen é considerado de baixa qualidade. O exame morfológico do sêmen serve muito bem como um teste para ingresso e acompanhamento de reprodutores em programas de inseminação artificial e para controle de qualidade das baterias de sêmen processadas por elucidar alterações induzidas por processos envolvidos na sua preservação (EVANS & MAXWELL, 1990).

A avaliação morfológica de espermatozóides de eqüídeos é similar a de outras espécies de mamíferos domésticos, exceto pela assimetria de inserção da cauda. Tal inserção é classificada como abaxial e é considerada normal (CBRA, 1998). Outra característica importante é a presença de um acrossoma pouco

desenvolvido, fato que pode dificultar a visualização de patologias nesta estrutura (MAGISTRINI, 2000).

Apenas a avaliação da morfologia espermática não deve ser utilizada para prever se o potencial de fertilidade de um ejaculado é alto, no entanto, este exame é razoável para afirmar que o potencial de fertilidade é baixo quando na presença de uma alta proporção de espermatozoides com anormalidades (DOTT, 1975).

Crítérios para classificar defeitos na morfologia espermática utilizados para eqüídeos vêm sendo adaptados de bovinos (JASKO, 1992). Em um dos critérios os defeitos são classificados como primários ou secundários (BLOM, 1950). Os primários são aqueles que ocorrem durante a espermatogênese e os secundários aqueles defeitos que ocorrem durante o transito espermático que antecede a ejaculação. A maior limitação desta classificação é que não se conhece a origem de todos os defeitos espermáticos. Além disso, os defeitos primários não são necessariamente mais deletérios à fertilidade que os defeitos secundários, fato que dificulta a interpretação dos resultados. Outro sistema de classificação divide os defeitos em maiores e menores de acordo com a influência na fertilidade (BLOM, 1973). Segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), na classificação andrológica de todas as espécies, as anormalidades espermáticas deve ser agrupada em defeitos maiores e menores.

Embora ensaios laboratoriais como o exame de morfologia espermática sejam utilizados na avaliação de amostras seminais, este teste não permite acesso a alterações que ocorrem em proporções subcelulares (KIRK *et al.*, 2005). Quando os defeitos morfológicos se expressam por alterações em escala nanométrica, ocorrem falhas nos métodos tradicionais de avaliação, havendo a necessidade do emprego da microscopia eletrônica (JOSHI *et al.*, 2001).

2.6.2- Testes de integridade das membranas e viabilidade do espermatozoide

A análise laboratorial da integridade espermática é fundamental na pesquisa e tecnologia de sêmen, visto que, é um requerimento essencial para a função celular como um todo (HARRISON & VICKERS, 1990; MEDINA, 1995; PINTADO *et al.*, 2000). Vários métodos para distinguir células viáveis e não

viáveis têm sido utilizados, tais como, a coloração por eosina-nigrosina (HANCOCK, 1951), teste hiposmótico e as com sondas fluorescentes.

2.6.2.1- Coloração supravital

O teste de coloração supravital avalia a integridade física da membrana plasmática. Este teste consiste da utilização de corantes derivados da fluoresceína em combinação ou não com outros corantes de fundo. A capacidade destes corantes em penetrar o compartimento nuclear dos espermatozóides depende da integridade das membranas (GARNER *et al.*, 1986). Desta forma, espermatozóides com a membrana lesada coram e com a membrana intacta não.

MELO (1999) utilizando a técnica de coloração de eosina-nigrosina em sêmen equino resfriado com diferentes meios diluidores, verificou uma alta correlação ($r=0,75$) entre a porcentagem de vivos (não corados) e a motilidade espermática total.

2.6.2.2- Teste hiposmótico

O teste hiposmótico, desenvolvido por JEYENDRAN *et al.* (1984) em sêmen humano, visa avaliar a integridade funcional da membrana espermática. Uma das propriedades da membrana plasmática é sua capacidade de permitir seletivamente o transporte de moléculas. Quando a célula espermática é exposta a um meio hipotônico (abaixo de 290 mOsm.), ocorre a passagem de água pela membrana plasmática para o interior da célula numa tentativa de restabelecer o equilíbrio osmótico entre o meio intra e extracelular. O aumento de volume, ou, “edemaciamento” do espermatozóide é particularmente visível na cauda, pois, a membrana plasmática que a envolve parece ser mais frouxamente aderida que a membrana que envolve a cabeça, por isso, a região enrola-se com facilidade. Segundo JEYENDRAN *et al.* (1984), pode-se relacionar o enrolamento da cauda com uma boa funcionalidade da membrana da cabeça, já que no seu trabalho houve correlação positiva entre caudas enroladas e penetração do espermatozóide em ovócitos de hamster. Após o trabalho inicial este teste tem sido usado com sucesso na avaliação do sêmen eqüino (NEILD *et al.*, 1999; FÜRST, 2002; MELO *et al.*, 2005), caprino (FONSECA *et al.*, 2005), bovino

(ROTA *et al.*, 2000) e asinino (TRIMECHE *et al.*, 1996). É considerado um método simples e acessível, podendo ser utilizado em adição as avaliações rotineiras (NEID *et al.*, 1999).

TRIMECHE *et al.* (1998) incubaram espermatozóides por uma hora em solução a 150 mOsmol de citrato de sódio e frutose, registrando um percentual de espermatozóides reativos variando de 47,6 a 64,8%, para sêmen congelado, e 73,6 % para sêmen fresco de animais da raça francesa Poitou. Já SERRES *et al.* (2002), seguindo metodologia de TRIMECHE *et al.* (1998), ao trabalhar com sêmen resfriado de jumentos da raça espanhola Zamorano Leonés, registraram uma média de células reativas de 60% e de 20%, respectivamente, para o sêmen fresco e resfriado, a 15 °C e 4 °C por 96 horas.

MIRÓ *et al.* (2005) trabalhando com jumentos da raça Catalã, utilizou o HOST como teste complementar em um estudo sobre características de subpopulações espermáticas no ejaculado. Para isso, os autores diluíram o sêmen em uma solução base de frutose e citrato de sódio em duas etapas. A primeira diluição isosmótica (solução 300 mOsm) e a segunda solução hiposmótica (150 mOsm). O tempo de incubação foi de 20 minutos a 37 °C, ao final obtiveram apenas 24% de células reativas ao teste, não registrando correlações significativas entre o teste e a avaliação da motilidade subjetiva e computadorizada. Concluíram que o HOST não foi capaz de prever características de viabilidade de membrana espermática com a metodologia empregada.

ALVAREZ *et al.* (2006) utilizaram o HOST para avaliação de sêmen congelado de jumentos da raça Zamorano Leonés. O sêmen foi congelado após a adição de colesterol ao meio diluidor pela incorporação com uso de ciclodextrina. Concluiu-se que o HOST não foi um bom teste para avaliação da integridade de membrana, para o tipo de metodologia empregada.

CANISSO (2008) utilizou o HOST para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática após a criopreservação do sêmen de jumentos da raça Pêga em dois diluidores de congelamento, de MARTIM *et al.* (1979) e de NAGASE & NIWA (1964). Para tal, utilizou metodologia descrita por MELO (1999), não observando diferenças quanto à reatividade ao teste (42,5 % e 42,6%) para os dois diluidores. Foi observada correlação média com a motilidade progressiva ($r= 0,53$ e $r=0,51$).

2.6.2.3- Testes com sondas fluorescentes

A técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural e/ou a funcionalidade de forma clara (CELEGHINI, 2005).

Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide, como o brometo de etídio (HALANGK *et al.*, 1984), corantes supravitais Hoechst 33258 (H258), 33342 (H342) (CASEY *et al.*, 1993; MAXWELL *et al.*, 1997), SYBR-14 (THOMAS *et al.*, 1998; GARNER *et al.*, 1999) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (HARRISON & VICKERS, 1990; PEÑA *et al.*, 1998; SOUZA, 2001; VALCÁRCEL *et al.*, 1994). No entanto, o iodeto de propídio (PI) vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana, seja isoladamente ou associado a outro corante fluorescente para avaliar membrana plasmática. Esta sonda possui afinidade pelo DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (GRAHAM *et al.*, 1990; MAXWELL *et al.*, 1997; ARRUDA, 2000; ARRUDA, *et al.*, 2003; CELEGHINI, 2005).

Isotiocianato de fluoresceína (FITC) é uma sonda fluorescente geralmente utilizada para analisar o *status* acrossomal do espermatozóide em muitas espécies (CROSS *et al.*, 1986; FARLIN *et al.*, 1992; SUKARDI *et al.*, 1997; PEÑA *et al.*, 1999). FITC é prendido a uma lectina, isolada da semente de plantas que especificamente se liga aos resíduos de açúcar (TROWBRIDGE, 1974). Aglutinina de *Pisum sativum* (PSA, aglutinina da ervilha) e aglutinina de *Arachis hypogaea* (PNA, aglutinina do amendoim) são as principais aglutininas usadas para determinar a integridade do acrossoma (GRAHAM, 2001). A lectina de amendoim cora o acrossoma com uma maior intensidade e com uma ligação menos específica que outras lectinas como a PSA (GRAHAM, 1996).

FARLIN *et al.* (1992) investigaram o uso da FITC-PSA para avaliar a integridade do acrossomo de células espermáticas eqüinas *in natura* ou submetidas à crioinjúria. Para tanto, misturas de diferentes proporções de espermatozóides com acrossomo intacto (sêmen fresco) e espermatozóides com acrossomo danificado (sêmen criopreservado) foram avaliadas. Houve correlação positiva entre a porcentagem de espermatozóides ligados ao FITC-PSA e a

proporção de espermatozóides com acrossomo danificado nas amostras ($r = 0,98$; $P < 0,05$), comprovando a eficiência de seu uso na determinação da integridade do acrossomo de espermatozóides (FARLIN *et al.*, 1992).

Comprovando a eficiência e especificidade do FITC-PSA na avaliação da integridade de membrana acrossomal, SOUZA (2001) comparou quatro diferentes técnicas para exame da membrana acrossomal: câmara úmida por microscopia de contraste de fase e de interferência diferencial, coloração por Trypan Blue/Giemsa e microscopia de epifluorescência, utilizando como marcador o FITC-PSA para amostras de sêmen equino pós descongelação. Neste trabalho, verificou-se que a técnica de microscopia de epifluorescência com a sonda fluorescente FITC-PSA é a mais eficiente em detectar lesões de acrossoma.

A associação de sondas fluorescentes, de forma a permitir a avaliação simultânea dos componentes celulares, é de fundamental importância para separar uma população de células que apresente características desejáveis (CELEGHINI *et al.*, 2007). Diversas associações de sondas foram utilizadas por diferentes pesquisadores nos últimos anos (GRAHAM *et al.*, 1990; HARRISON & VICKERS, 1990; GARNER *et al.*, 1997; THOMAS *et al.*, 1998; SOUZA, 2001; ARRUDA & CELEGHINI, 2003).

CELEGHINI *et al.* (2007) preconizando a avaliação simultânea de uma mesma célula espermática bovina, de forma clara e fácil, testaram e validaram quatro técnicas de associação de sondas para bovinos, analisadas no microscópio de epifluorescência. Dentre as técnicas validadas (PI, FITC-PSA e MITOTRACKER GREEN FM; PI, FITC-PSA e CMXRos ou PI, FITC-PSA e JC-1), a autora concluiu ser a associação das sondas PI, FITC-PSA e JC-1 é a melhor para ser utilizada, já que esta permite separar duas populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial de maneira mais clara.

A partir destes resultados, NASCIMENTO *et al.* (2005) utilizou com sucesso a associação do PI, FITC-PSA e JC-1 para análise, por microscopia de epifluorescência, do sêmen equino criopreservado.

2.6.3- Avaliação da cinética espermática

O espermatozóide sofre maturação durante o trânsito e estocagem no epidídimo, adquirindo competência funcional devido a uma série de mudanças morfológicas e fisiológicas. A mudança mais óbvia com relação à maturação do espermatozóide é a aquisição da habilidade de se mover quando este entra em contato com o plasma seminal e outros meios fisiológicos. O espermatozóide deve movimentar-se no muco cervical, atravessar o útero, entrar no oviduto e alcançar a porção da ampola onde a fertilização ocorre (MORTIMER, 1997).

Acredita-se que a motilidade seja uma das mais importantes características associadas à habilidade de fertilização do espermatozóide. Esse parâmetro da cinética tem sido reconhecido por muito tempo como sendo essencial para o transporte do sêmen no trato reprodutivo da fêmea e para a fertilização, sendo considerado uma expressão da viabilidade e integridade estrutural do espermatozóide (VERSTEGEN *et al.*, 2002).

2.6.3.1- Avaliação subjetiva da cinética espermática

Usualmente a motilidade espermática é estimada em análise do sêmen por microscopia óptica, entre lâmina e lamínula. Entretanto, este tipo de análise manual é impreciso, mesmo quando realizado por técnicos experientes as análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva do teste, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (ARRUDA *et al.*, 2007).

2.6.3.2- Avaliação computadorizada da cinética espermática (CASA – Computer-assisted semen analyses)

Com o objetivo de aumentar a repetibilidade para avaliação do movimento espermático tem-se utilizado a análise computadorizada. Programas computadorizados utilizados para a avaliação espermática podem ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade às avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de movimento espermático. O poder de análise

deste tipo de teste é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozóides com alto grau de objetividade, podendo assim aperfeiçoar o processo de avaliação seminal em animais (ARRUDA, 2000).

Nesta avaliação, a trajetória da cabeça de espermatozóides presentes na amostra é reconstituída (MORTIMER & MAXWELL, 2004). A CASA proporciona a oportunidade de acessar múltiplas características em uma única amostra de espermatozóides. Diferenças na motilidade de células espermáticas são mais visíveis pela CASA que em métodos subjetivos (FARREL *et al.*, 1998).

Além da motilidade espermática total (MT) e progressiva (MP) três valores para velocidade são comumente medidos pela CASA e usados para a descrição do movimento espermático: a velocidade curvilínea (VCL), a velocidade em linha reta ou progressiva (VSL) e a velocidade média do trajeto (VAP). Cada uma dessas velocidades descreve um aspecto diferente da trajetória do espermatozóide (Figura 4). O trajeto curvilíneo é uma projeção bidimensional da verdadeira trajetória tridimensional. A VCL é calculada pela somatória das distâncias ao longo da trajetória curvilínea percorrida, corrigindo o tempo gasto. O valor de VSL é determinado encontrando-se a distância em linha reta entre os primeiros e os últimos pontos da trajetória em relação ao tempo. Este valor fornece o espaço ganho dentro de um período. O valor de VAP fornece uma indicação do comprimento da trajetória geral do espermatozóide e é calculado encontrando-se o comprimento do caminho médio em relação ao tempo gasto. A amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) é utilizada como uma aproximação da amplitude do batimento flagelar. A frequência do batimento flagelar (BCF) foi desenvolvida baseada nos fatos de que cada ponto no vértice é resultado da mudança no batimento, e cada momento em que o caminho curvilíneo cruza o caminho médio é o resultado de um novo batimento flagelar. Os valores de retilinearidade (STR), uma comparação da linha reta com a média das trajetórias, fornecem uma indicação da relação entre o espaço ganho e a trajetória geral do espermatozóide, calculados como $VSL \times VAP^{-1} \times 100$. Uma trajetória com pontos espaçados de forma uniforme e com baixa amplitude, teria um valor alto de STR, uma vez que o caminho médio seria próximo do caminho em linha reta. Uma trilha circular teria um baixo STR. A linearidade (LIN), uma comparação da linha reta e as trajetórias curvilíneas, é uma expressão da relação entre a projeção bi-dimensional do caminho tri-dimensional adotado pelo espermatozóide

e seu ganho de espaço, calculado como $VSL \times VCL^{-1} \times 100$. Uma trajetória circular teria uma baixa LIN, pois o caminho curvilíneo seria muito maior do que o espaço ganho. Uma alta LIN na trajetória é aquela em que o espermatozóide percorre um caminho curvilíneo com uma amplitude relativamente baixa do ALH e a direção geral do movimento é a mesma do caminho em linha reta (MORTIMER, 1997).

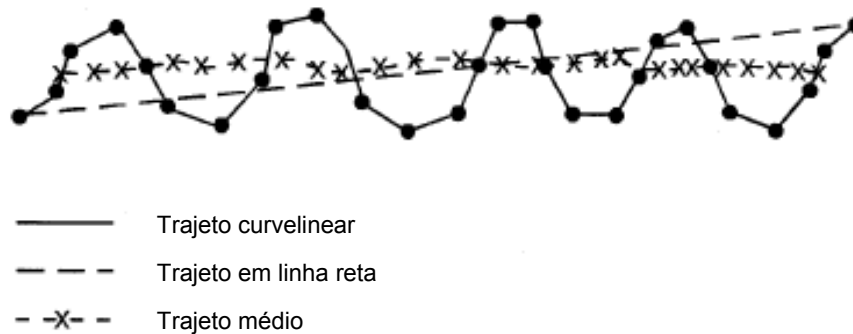


Figura 4: Caminhos utilizados no cálculo da velocidade da cabeça dos espermatozóides. O comprimento de cada caminho em questão é corrigido (distância/tempo) para dar a velocidade. Por exemplo, a distância percorrida ao longo do trajeto curvelinear dividido pelo tempo é a velocidade curvelinear (VCL), etc. (MORTIMER, 1997).

Alguns valores dos parâmetros observados pela CASA têm sido correlacionados com eventos fisiológicos. O padrão de cinética do espermatozóide no sêmen de humanos, caracterizado, por uma motilidade altamente progressiva associada a um significativo movimento lateral de cabeça, tem sido correlacionado com a habilidade de penetrar no muco cervical (SERRES *et al.*, 1984; AITKEN *et al.*, 1985; FENEUX *et al.*, 1985; MORTIMER *et al.*, 1986). O VCL e o VAP também têm sido utilizados para prever resultados nos processos de fertilização, visto que, ambos os parâmetros são aumentados após a capacitação espermática (VERSTEGEN *et al.*, 2002). JASKO *et al.* (1992) verificaram por meio da análise computadorizada uma correlação entre algumas características do movimento espermático, como, motilidade total (MOT), motilidade progressiva (PROG) e velocidade média do trajeto (VAP) com fertilidade.

Uma grande possibilidade foi criada com o uso de taxas de aquisição de imagens de 60 Hz combinada ao aumento da resolução do sistema óptico e de melhores computadores, que em conjunto, permitiram a avaliação do espermatozóide hiperativado (VERSTEGEN *et al.*, 2002). Desta forma, vários

autores têm investigado os padrões do movimento hiperativado dos espermatozoides de várias espécies e utilizado esses valores na comparação do comportamento da cinética espermática em diferentes condições fisiológicas e ambientes *in vitro* (MORTIMER, 1997).

2.6.4- Teste de termo resistência (TTR)

Os parâmetros avaliados no TTR são motilidade espermática e vigor espermático, com as avaliações começando no tempo zero (momento em que o sêmen é descongelado) e sendo realizadas em intervalos de 30 minutos, por períodos que variam entre 90 minutos (COCHRAN *et al.*, 1984), 180 minutos (MATTOS *et al.*, 1993) e 240 minutos (CBRA, 1998). Os resultados do TTR são influenciados por vários fatores, dentre eles: o efeito do ejaculado, método de congelamento e efeito do tempo e temperatura de incubação, sendo esta última a variável mais importante para o sêmen eqüino (FÜRST, 2006).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Local e período experimental

O experimento foi realizado no Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa – MG, latitude 20°45'14'' sul e a uma longitude 42°52'55'' oeste; e no haras Tarumã, localizado no município de Guaraciaba – MG, latitude 20°34'15'' sul e a uma longitude 43°00'28'' oeste, durante os meses de junho de 2009 a janeiro de 2010.

3.2- Manejo dos animais

Cinco jumentos da raça Pêga comprovadamente férteis, conforme exame andrológico e histórico reprodutivo, foram utilizados como doadores de sêmen. Estes foram mantidos em baias durante a noite e soltos durante o dia. Como alimentos recebiam volumoso a base de capim napier picado (*Pennisetum purpureum*) e concentrado farelado, nas quantidades que atendem as exigências nutricionais da espécie (NRC, 2007).

3.3- Coleta de sêmen

Foram utilizados cinco jumentos com idade entre 2,5 e 7 anos como doadores de sêmen. Antes do início do período experimental os animais foram submetidos ao processo de esgotamento das reservas espermáticas extragonadais, realizando-se uma coleta diária durante sete dias.

O sêmen foi coletado em dias alternados, utilizando vagina artificial (modelo Hannover), devidamente preparada com água aquecida à temperatura de 45°C. Foram realizadas cinco coletas de cada animal, totalizando 25 ejaculados. Após a coleta, foi avaliado o volume sem gel do ejaculado, além das características de motilidade espermática total (0-100%), vigor espermático (0-5) e concentração (câmara de Neubauer, após diluição de 1 parte de sêmen para 100 partes de formol salino) por microscopia de contraste de fase em objetiva de 400 x. Foram colhidas amostras de 100 µL de sêmen em *tubos plásticos* contendo 1 mL de solução de formol salino (HANCOCK, 1957) para posterior avaliação da morfologia espermática. Somente aqueles ejaculados que apresentaram motilidade espermática superior ou igual a 70% para o sêmen fresco foram empregados neste estudo.

3.4- Preparo da solução de ciclodextrina carregada com colesterol (CLC)

Metil-β-ciclodextrina foi carregada com colesterol adotando a metodologia descrita por PURDY & GRAHAM (2004). Onde, 200 mg de colesterol (C3045; Sigma) foram dissolvidos em 1 mL de clorofórmio (JT-Baker) em um tubo de vidro. Em um becker foi dissolvido 1 g de metil-β-ciclodextrina (C4555; Sigma) em 2 mL de metanol (SYNTH). Em seguida, uma alíquota de 0,45 mL da solução de colesterol + clorofórmio foi adicionada à solução de ciclodextrina, e a mistura agitada até ficar clara. Depois, a mistura foi colocada em uma placa de Petri de vidro e os solventes foram removidos por evaporação usando placa aquecedora a temperatura de 40°C por um período de 48 horas. Os cristais resultantes foram removidos da placa por raspagem, com auxílio de uma espátula, e estocados em tubos de vidro a 22°C.

A solução de trabalho de CLC foi preparada pela adição de 50 mg de CLC em 1 mL de diluidor STALP (Anexo 1) a 37°C e homogeneizada por agitação

com auxílio de um agitador vortex. Esta solução foi mantida congelada -80°C até sua utilização, quando era aquecida a 37°C e homogeneizada antes da incubação com sêmen.

3.5- Tratamento com CLC e processamento do sêmen

O sêmen coletado e avaliado foi diluído com diluidor STALP para concentração de 120 milhões de espermatozóides totais por mL. As amostras foram então divididas em 4 tubos cônicos de centrífuga de 15 mL, onde foram submetidas aos seguintes tratamentos: **tratamento 1** – T1 = adição de 1,0 mg de CLC/120 milhões espermatozóides totais; **tratamento 2** – T2 = adição de 2,0 mg de CLC/120 milhões totais, **tratamento 3** – T3 = adição de 3 mg de CLC/120 milhões de espermatozóides totais e **controle** – CT = sem adição de colesterol.

As amostras de sêmen foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Após o período de incubação, o sêmen diluído foi centrifugado a 600 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, a concentração espermática no *pellet* remanescente foi determinada, e os espermatozóides foram ressuspensos para a concentração final de 200 milhões de espermatozóides/mL com diluente a base de lactose-EDTA, contendo 5% de glicerol (Anexo 2).

3.6- Congelamento do sêmen

Após a ressuspensão as amostras foram envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL. As palhetas foram resfriadas a uma taxa média de -0,5°C por minuto até 5°C, seguindo metodologia descrita por FÜRST *et al.* (2005), sendo então congeladas em vapor de nitrogênio após manutenção por 15 minutos a 4 cm do nitrogênio (-60 °C/min) (COCHRAN *et al.*, 1984). As palhetas foram imersas em nitrogênio líquido com o objetivo de armazenamento em botijões criogênicos para posteriores análises (motilidade espermática total, vigor espermático, HOST, vivos e mortos, morfologia, TTR, CASA, teste com sondas fluorescentes).

3.7- Descongelamento do sêmen

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos (CBRA, 1998) para posteriores análises.

3.8- Testes *in vitro* para avaliar a viabilidade espermática do sêmen descongelado

3.8.1- Avaliação subjetiva do movimento espermático:

As palhetas foram descongeladas e mantidas em tubos plásticos de 1,5 mL, 6 µL de cada amostra foram colocados sobre lâmina e sob lamínula para avaliação da motilidade espermática total (0-100%) e vigor espermático (0-5) pelo método de duplo cego. Todo material que entrou em contato com o sêmen estava pré-aquecido a 37 °C. As leituras foram realizadas em microscopia de contraste de fase com objetiva de 400x.

3.8.2- Avaliação computadorizada do movimento espermático:

Cada amostra foi descongelada em banho-maria a 37 °C por 30 segundos. Diluiu-se 100 µL de sêmen em 100 µL de STALP (pré-aquecido a 37°C) em *tubos plásticos*, onde foi acrescido 100 µL do corante fluorescente HTM-Ident® (Hoechst # 33258, 80 µg/mL) para posterior incubação a 37°C por 10 minutos. As leituras foram realizadas em aparelho IVOS-Ultimate® da Hamilton-Thorn Bioscience, sendo utilizado o programa *Animal Motility* para análise dos dados. O aparelho foi previamente ajustado para análise do sêmen equino, na versão Ident, conforme anexo 3. As características de movimento espermático analisadas foram: motilidade total (MOT, %) motilidade progressiva (PROG, %), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimentos flagelares (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %). Os exames foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, campus Pirassununga-SP.

3.8.3- Teste hiposmótico (HOST):

Foram diluídos 100 µL de sêmen em 1 mL de solução de sacarose 100 mOsmol (Anexo 4), estes foram incubados a 37°C/60 min., sendo, posteriormente, fixados com 0,5 mL de solução de formol salino (HANCOCK, 1957) para posterior leitura. As células foram classificadas pela presença ou ausência de cauda enrolada, segundo padrões descritos por NEILD *et al.* (2000). O cálculo da reação hiposmótica foi realizado por meio da seguinte fórmula: $HOST = (\% \text{ de caudas enroladas após o HOST}) - (\% \text{ de caudas enroladas antes do HOST})$ conforme descrito por MELO & HENRY (1999).

3.8.4- Coloração supravital (vivos e mortos):

A coloração supravital foi realizada utilizando o corante eosina-nigrosina a 0,5%. Amostras de 10 µL do sêmen foram incubados com 10 µL do corante em placa aquecedora a 37 °C por 3 min. Após incubação confeccionou-se um esfregaço para realização da leitura. Foram classificados como vivos os espermatozóides que não se coraram e como mortos aqueles que apresentaram o núcleo corado de vermelho.

3.8.5- Teste com sondas fluorescentes:

Foi utilizado a associação de duas sondas fluorescentes, o iodeto de propídio e o FITC-PNA (Anexo 5), para avaliação da membrana plasmática e do acrossoma dos espermatozóides descongelados. Uma amostra de 150 µL do sêmen descongelado foi colocado em um tubo plástico de 1,5 mL onde foram adicionados 3 µL de iodeto de propídio (0,5 mg/mL em DPBS) e 80 µL de FITC-PNA (100 µL/mL em DPBS). A amostra foi incubada a temperatura de laboratório por 8 minutos ao abrigo de luz. Após a incubação, uma gota de 6 µL da solução foi utilizada para preparo da câmara úmida, entre lâmina e lamínula e a leitura foi realizada em microscopia de epifluorescência, utilizando-se filtros de 480 a 610 nm (fluoresceína e rodamina, respectivamente) e aumento de 1.250 vezes por objetiva de imersão. As leituras foram realizadas identificando as células em campo claro, quando a luz era reduzida para avaliar a fluorescência emitida ou

não. O padrão de emissão de fluorescência foi: membrana plasmática lesadas – vermelho fluorescente; membrana plasmática intacta – não corada; acrossoma lesado – verde fluorescente; acrossoma intacto – não corado. As células foram então classificadas em 4 grupos:

- **MIAI**: membrana plasmática intacta e acrossoma intacto .
- **MIAL**: membrana plasmática intacta e acrossoma lesado.
- **MLAI**: membrana plasmática lesada e acrossoma intacto.
- **MLAL**: membrana plasmática lesada acrossoma lesado.

3.8.6- Teste de termo resistência (TTR):

A longevidade dos espermatozóides congelados/descongelados foi avaliada por meio do teste de termo resistência. Após o descongelamento, uma alíquota de 200 µL do sêmen foi incubado em tubos plásticos de 1,5 mL em banho-maria a 37°C por 120 minutos. Foram realizadas avaliações subjetivas, por método de duplo cego (dois avaliadores), em microscopia de contraste de fase, da motilidade e do vigor. Utilizou-se preparo em câmara úmida, com lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37°C), sendo as leituras realizadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos de incubação.

3.8.7- Morfologia espermática:

Uma amostra de 100 µL do sêmen foi acondicionada em tubos plásticos de 1,5 mL contendo 1,0 mL de solução de formol salino (HANCOCK, 1957) pré aquecido a 37°C. A análise da morfologia foi realizada por preparo de câmara úmida em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1000 x, seguindo classificação descrita por BLOM (1973), onde as anormalidades foram divididas em defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais.

A figura 5 ilustra de forma simplificada o processamento de sêmen durante a criopreservação.

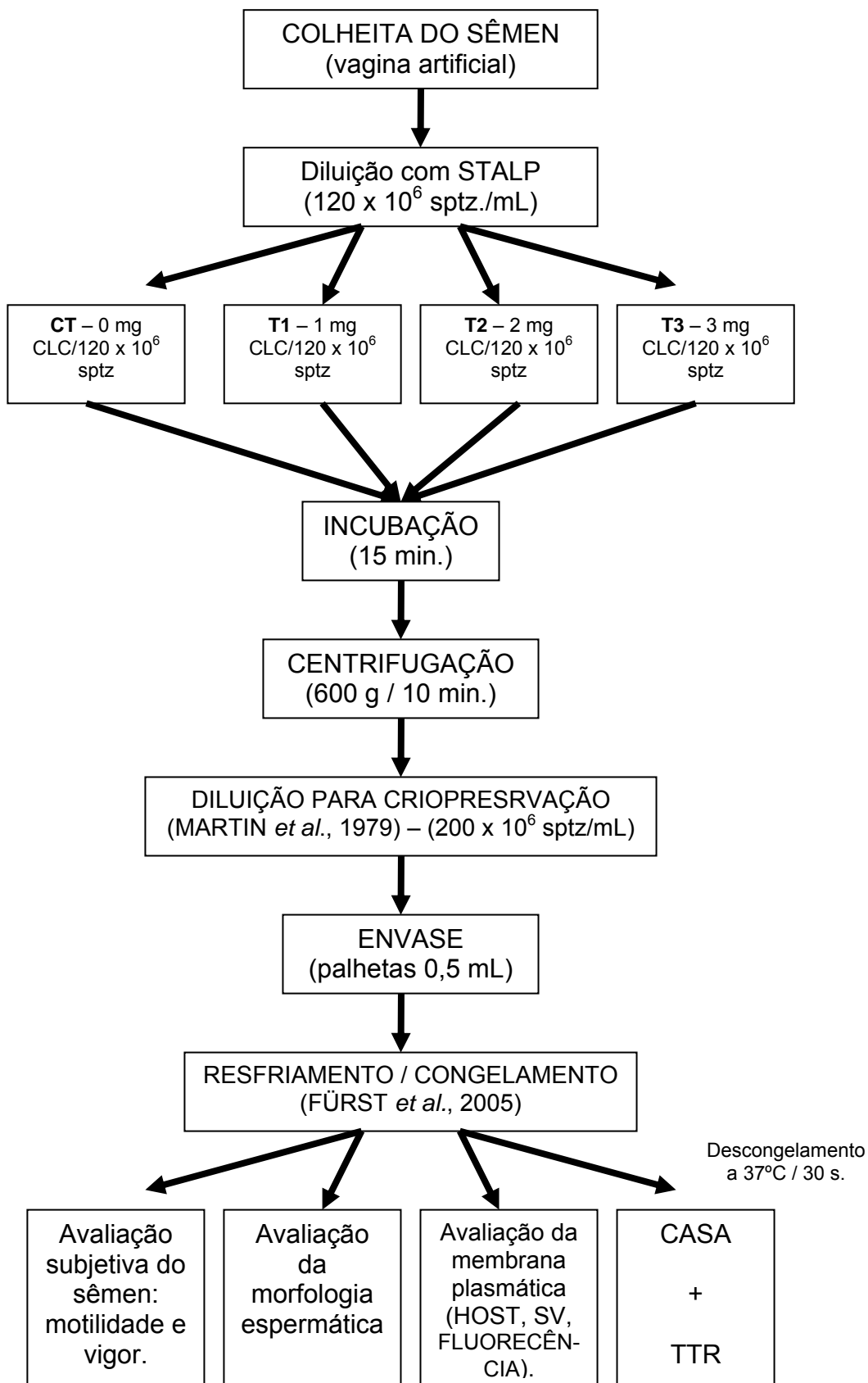


Figura 5: Esquema simplificado do processamento do sêmen para criopreservação.

3.9- Análise estatística

Para as variáveis quantitativas, efetuaram-se os testes de Lilliefors para verificar normalidade dos dados, e Cochran (números iguais de repetições dentro de cada nível) e Bartlett (números desiguais de repetições) para verificar a homogeneidade das variâncias dos grupos. Aqueles dados que não atenderam a premissa da ANOVA, foram submetidos à análise não paramétrica e as médias comparadas pelos testes de Kruskal-Wallis com probabilidade de erro de 5%. As variáveis que atenderam às premissas, foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) com 5% de probabilidade de erro.

A Correlação Simples de Pearson foi testada entre as variáveis (motilidade espermática progressiva – MOT e PROG (CASA), reativos ao HOST, íntegros pelo teste de epifluorescência e não corados pelo teste de vivos e mortos) para verificar possíveis relações entre as características estudadas.

Foi utilizado o programa estatístico SAEG-UFV 9.1 (UFV, 2007).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios para as principais características físicas do sêmen fresco dos cinco jumentos (volume, concentração espermática, número total de espermatozoides, motilidade espermática total e vigor espermático) estão sumarizados na TABELA 1.

Tabela 1– Valores médios e desvios padrão das características físicas do sêmen fresco de jumentos da raça Pêga.

Jumento	Volume de sêmen sem gel (mL)	Concentração (espermatozoides $\times 10^6$ /mL)	Número total de espermatozoides ($\times 10^9$)	Motilidade total (%)	Vigor (0-5)
J1	43,0 \pm 13,6 ^{BC}	405,0 \pm 230,9 ^A	15,5 \pm 3,7 ^A	82 \pm 2,7 ^{AB}	4,0 ^A
J2	62,9 \pm 3,2 ^A	305,4 \pm 109,7 ^A	19,2 \pm 6,9 ^A	83 \pm 2,7 ^A	4,0 ^A
J3	53,3 \pm 9,1 ^{AB}	278,0 \pm 67,5 ^A	14,6 \pm 3,7 ^A	85,0 ^A	4,0 ^A
J4	37,4 \pm 10,8 ^C	417,0 \pm 109,9 ^A	15,5 \pm 5,9 ^A	80,0 ^B	3,9 \pm 0,2 ^A
J5	14,4 \pm 8,6 ^D	427,0 \pm 146,1 ^A	5,1 \pm 1,0 ^B	85,0 ^A	3,9 \pm 0,2 ^A
Geral	42,2 \pm 18,9	366,5 \pm 145,7	14,0 \pm 6,4	83,0 \pm 2,5	3,9 \pm 0,1

Valores seguidos por letras diferentes (A, B, C, D) sobrescritas na mesma coluna diferem ($P < 0,05$) pelo teste SNK.

O volume de sêmen sem gel, assim como a concentração espermática são características que mais sofrem variações com a idade, frequência de coletas, estímulo sexual, raça, estação de ano e a própria variação individual (PAPA, 1987). Os valores observados para o volume dos diferentes ejaculados e animais estão dentro do relatado para a espécie que tem variado de 10 a 158 mL (MORAIS, 1990; LEITE, 1994, GEBERS, 1995; CANISSO *et al.*, 2008b). No entanto, a média geral do volume livre de gel obtido nas 25 coletas (42,2 \pm 18,9 mL) foi inferior ao observado por outros autores para animais da raça Pêga (MORAIS, 1990; COSTA, 1991; GEBERS, 1995). Tal fato pode ser justificado pelo

maior intervalo (> 48 hrs.) entre coletas praticadas por estes autores. Realizando coletas em jumentos da raça Pêga em intensidade semelhante a realizado no presente estudo, CANISSO (2008a), obteve média de $47,3 \pm 28,7$ mL de volume.

A concentração espermática média foi de $366,5 \pm 145,7 \times 10^6$ espermatozoides por mL. Esta concentração se encontra dentro do estabelecido como normal para espécie, que varia de 100 a 800 milhões de espermatozoide por mL (KREUCHAUF, 1984). Segundo o mesmo autor a média do número de espermatozoides totais no ejaculado de jumentos é de 20 a 30 bilhões, estando os extremos entre 2 e 44 bilhões. Os valores obtidos no presente estudo para J1, J2, J3 e J4 estão um pouco abaixo da média para espécie (TABELA 1). Tal fato, pode também ter se dado pela frequência de coletas de sêmen a que os animais foram submetidos no presente estudo, com intervalo de 48 horas. O quinto jumento (J5) apresentou uma menor produção espermática total, provavelmente devido a um menor desenvolvimento testicular, uma vez que este animal era mais jovem (2,5 anos).

Os valores médios de motilidade espermática total ($83,0 \pm 2,5\%$) e vigor espermático ($3,9 \pm 0,1$) observados no presente estudo encontram-se dentro dos valores citados na literatura, onde a motilidade varia de 70-100% e o vigor de 3-5 (FERRERIA, 1993; LEITE, 1994; GEBERS, 1995; CANISSO, 2008b;). Fato importante foi a baixa variação entre animais e entre coletas de um mesmo animal. Tais características demonstram que a frequência de coletas utilizada não afetou os parâmetros motilidade e vigor, e que os animais apresentavam alta homogeneidade com relação a estes parâmetros, diminuindo a variação na avaliação experimental.

Os valores médios registrados para anormalidades espermáticas do sêmen fresco foram de $5,9 \pm 2,3\%$ de defeitos maiores, $2,3 \pm 1,5\%$ de defeitos menores e $8,2 \pm 2,7\%$ de defeitos totais (TABELA 2).

Tabela 2 - Valores médios e desvios padrão dos percentuais das anormalidades espermáticas do sêmen fresco de jumentos da raça Pêga.

Jumento	Defeitos maiores (%)	Defeitos menores (%)	Defeitos totais (%)
J1	6,2 ± 2,1 ^{AB}	2,8 ± 0,8 ^A	9,0 ± 2,5 ^A
J2	6,8 ± 2,3 ^{AB}	3,4 ± 2,4 ^A	10,2 ± 3,7 ^A
J3	3,6 ± 1,1 ^B	2,2 ± 1,1 ^A	5,8 ± 1,3 ^A
J4	5,0 ± 1,2 ^{AB}	2,2 ± 1,6 ^A	7,2 ± 1,3 ^A
J5	8,0 ± 2,1 ^A	1,2 ± 0,8 ^A	9,2 ± 2,0 ^A
Geral	5,9 ± 2,3	2,3 ± 1,5	8,2 ± 2,7

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste SNK.

Jumentos de uma forma geral apresentam quantidade reduzida de defeitos espermáticos. GEBERS (1995) registrou uma média 8,6% de defeitos totais após diferentes frequências de coleta de sêmen de 6 jumentos da raça Pêga. Estas médias são semelhantes às registradas por ARRUDA *et al.* (1989) – raça brasileira e KREUCHAUF – jumento africano (1984), com valores de 7,46 e 6,15%, respectivamente. Outros autores têm relato valores mais altos de defeitos espermáticos para jumentos, como, HENRY *et al.* (1987) – raça nordestina, 13,35%, MORAIS (1990) e CANISSO (2008a) – raça Pega, com 15,6% e 14,77%, respectivamente. Além das características inerentes ao animal (idade, genética) e seu manejo, a realização de coletas para esgotamento das reservas extragonadais pode influenciar o percentual de defeitos espermáticos no ejaculado (GEBERS, 1995). Todos os resultados obtidos e relatos estão dentro dos padrões normais para equinos (CBRA, 1998)

Os valores médios da motilidade espermática total e vigor espermático após a incubação (por 15 min.) com as diferentes concentrações de colesterol incorporado à ciclodextrina - CLC (1, 2 e 3 mg / 120 x 10⁶ de espermatozoides por mL), pós – ressuspensão e resfriamento encontram-se sumarizados na TABELA 3.

Tabela 3 – Motilidade espermática total (MOT) e vigor espermático durante as diferentes etapas do processo de congelamento de sêmen de jumentos da raça Pêga para as diferentes concentrações de CLC (médias ± desvios padrão).

Tratamento CLC*	Pós - incubação		Pós - ressuspensão		Pós - resfriamento	
	MOT (%)	Vigor**	MOT (%)**	Vigor**	MOT (%)**	Vigor
0 mg	78,0 ± 4,1 ^A	3,9 ± 0,2 ^a	74,8 ± 6,7 ^a	3,5 ± 0,1 ^a	69,9 ± 15,4 ^a	3,2 ± 0,25 ^A
1 mg	78,8 ± 3,5 ^A	3,8 ± 0,2 ^a	77,0 ± 4,1 ^a	3,6 ± 0,2 ^a	74,0 ± 4,5 ^a	3,3 ± 0,3 ^A
2 mg	79,0 ± 3,2 ^A	3,5 ± 0,1 ^b	77,2 ± 4,1 ^a	3,6 ± 0,2 ^a	75,8 ± 2,8 ^a	3,4 ± 0,2 ^A
3 mg	79,0 ± 2,5 ^A	3,5 ± 0,1 ^b	76,6 ± 3,4 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	72,2 ± 4,8 ^a	3,2 ± 0,3 ^A
Geral	78,7 ± 3,4	3,7 ± 0,2	76,4 ± 4,8	3,5 ± 0,2	73,0 ± 8,7	3,3 ± 0,3

* Tratamentos: CLC 120 x 10⁶ espermatozoides totais.

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste SNK.

** Valores seguidos por letras diferentes (a, b) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste Kruskal-Wallis.

Após a incubação foi observada uma queda no vigor espermático para as concentrações 2 e 3 mg de CLC. Este fato se deu principalmente devido a uma maior aglutinação dos espermatozóides quando aumentava a concentração de CLC. MEIRELLES *et al.* (1998) trabalhando com sêmen resfriado de garanhões em leite em pó e UHT observou maior aglutinação de espermatozóides em marcas de leite que continham maior quantidade de gordura. A presença de maior quantidade de colesterol pode ter contribuído para maior aglutinação nos tratamentos 2 e 3 mg. As aglutinações foram ausentes para o controle e aumentavam à medida que aumentava a concentração de ciclodextrina. O colesterol quando diluído com STALP não forma uma solução homogênea, formando duas fases após um período de repouso, estas fases são compostas por grandes partículas de associações entre colesterol e ciclodextrina. Os espermatozóides tendiam a se agrupar ao redor destas partículas reduzindo sua velocidade de movimentação, logo o vigor. Após a centrifugação e ressuspensão dos *pellets* de espermatozóides, as aglutinações se desfaziam justificando a não variação do vigor entre os tratamentos para as amostras após a ressuspensão e após o resfriamento. A não variação da motilidade espermática e do vigor espermático entre os tratamentos após os momentos acima citados ilustram a não influencia do colesterol incorporado a ciclodextrina para estas etapas durante o congelamento de sêmen. TORRES *et al.* (2006) relatou um aumento na motilidade total e na integridade da membrana plasmática de espermatozóides de garanhões resfriados após a adição de ciclodextrina ao meio diluidor. Estes resultados corroboram aos de ALVAREZ *et al.* (2005) que observou o mesmo efeito ao trabalhar com sêmen de jumentos resfriados por 24 e 48 horas. O tempo de resfriamento realizados no presente estudo (1 hora) pode ter sido insuficiente para demonstrar o efeito da incorporação de CLC nos parâmetros físicos do sêmen asinino resfriado.

Na TABELA 4 é ilustrado a influência da incorporação de colesterol conjugado a ciclodextrina nos parâmetros físicos do sêmen de jumentos criopreservados após avaliação subjetiva do movimento espermático (motilidade total e vigor) e na morfologia espermática.

Tabela 4 – Médias e desvios padrão da avaliação da motilidade espermática total (MOT) e vigor espermático; e das alterações percentuais na morfologia espermática (Dma - defeitos maiores, Dme - defeitos menores, Dtot - defeitos totais) de espermatozóides descongelados de jumentos da raça Pêga após o tratamento com diferentes concentrações de colesterol incorporado a ciclodextrina (CLC).

Tratamento CLC*	Avaliação subjetiva		Morfologia espermática		
	MOT (%)	Vigor	Dma (%)	Dme (%)	Dtot (%)
0 mg	65,0 ± 17,4 ^a	3,0 ± 0,2 ^A	6,8 ± 2,6 ^A	2,4 ± 1,6 ^B	9,2 ± 2,5 ^{AB}
1 mg	72,4 ± 9,8 ^a	2,9 ± 0,2 ^A	6,0 ± 3,2 ^A	4,4 ± 2,3 ^A	10,5 ± 3,1 ^A
2 mg	72,2 ± 9,1 ^a	3,0 ± 0,2 ^A	5,2 ± 2,3 ^A	2,6 ± 2,2 ^B	7,8 ± 3,2 ^B
3 mg	70,0 ± 16,3 ^a	2,9 ± 0,2 ^A	5 ± 2,3 ^A	3,2 ± 2,0 ^B	8,3 ± 3,2 ^B
Geral	69,9 ± 13,8	2,9 ± 0,2	5,8 ± 2,8	3,2 ± 2,2	9,0 ± 3,0

* Tratamentos: CLC / 120 x 10⁶ espermatozóides totais.

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste SNK.

** Valores seguidos por letras diferentes (a, b) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste Kruskal-Wallis.

Não foi observada diferença para os parâmetros físicos do sêmen (motilidade espermática total e vigor espermático) entre os tratamentos pela avaliação subjetiva, com média geral de 69,9 ± 13,8% e 2,9 ± 0,2%, respectivamente. OLIVEIRA *et al.* (2010) após criopreservarem sêmen de garanhões por metodologia semelhante à utilizada no presente estudo, não observaram diferença entre o grupo tratado com CLC e o grupo controle na avaliação da motilidade progressiva (CLC - 20,4 ± 13,7% e CT- 20,0 ± 10,0%). Os mesmos autores observaram um aumento no vigor das células tratadas com CLC quando comparado ao controle, 2,6 ± 0,5 e 2,3 ± 1,0, respectivamente.

Poucos estudos têm utilizado a morfologia espermática como critério para avaliar o sêmen congelado de jumentos. Os resultados obtidos no presente estudo foram inferiores aos observados por SILVA *et al.* (1997), que relatou 24% e 24,2% de defeitos totais para o sêmen de jumento congelado em macrotubos e tubo de alumínio, respectivamente. CANISSO (2008a), ao trabalhar com jumentos da raça Pêga, relatou 16,9% e 17,14% de defeitos totais após criopreservar sêmen asinino em dois meios diluidores de congelamento.

Apesar da pequena diferença observada entre os tratamentos, todos os valores de defeitos maiores e menores estão dentro dos observados na literatura como normal para a espécie (GEBERS, 1995; SILVA, 1995; CANISSO, 2008a; KER, 2010). As variações observadas, sempre menores que 3%, não foram consideradas representativas.

Os resultados provenientes da avaliação computadorizada do movimento espermático, para o sêmen congelado/descongelado, encontram-se sumarizados na TABELA 5.

As médias da motilidade total (CT: $64,2 \pm 20,2\%$; T1: $74,8 \pm 16,9\%$; T2: $80,0 \pm 11,8\%$; T3 : $81,1 \pm 14,5\%$) e progressiva (CT: $35,7 \pm 16,4\%$; T1: $46,5 \pm 15,3\%$; T2: $47,9 \pm 14,2\%$; T3: $49,2 \pm 13,5\%$) foram superiores para os tratamentos quando comparadas ao grupo controle ($P < 0,05$), não diferindo entre tratamentos ($P > 0,05$). Tal fato corrobora as observações de COMBES *et al.* (2000), PURDY & GRAHAM (2004) e MORRIER & BAILEY (2005) que ao trabalharem com ganhões, touros e carneiros, respectivamente, observaram um aumento da motilidade após criopreservar espermatozóides com adição da CLC. Este aumento na motilidade se deve provavelmente a uma maior estabilidade da membrana plasmática, em baixas temperaturas, quando da adição do colesterol. Esta maior estabilidade garante menos alterações à membrana mantendo a motilidade mais alta. OLIVEIRA *et al.* (2010) não observaram aumento da motilidade após criopreservar espermatozóides de ganhões acrescidos de CLC. Estes autores realizaram apenas avaliação subjetiva do movimento espermático, podendo pequenas diferenças não terem sido perceptíveis, uma vez que foi demonstrado uma redução no percentual de lesões de membrana para o tratamento com CLC.

Tabela 5 - Médias e desvios padrão dos parâmetros MOT (motilidade total), PROG (motilidade progressiva), VAP (velocidade de trajeto), VCL (velocidade curvilínea), VSL (velocidade progressiva), ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça), BCF (frequência de batimento flagelar), STR (retilinearidade), LIN (linearidade) do sêmen asinino acrescido de diferentes concentrações de CLC.

Parâmetros	CLC dose (mg/120 x 10 ⁶ espermatozóides totais)				Geral
	0	1	2	3	
MOT (%)	$64,2 \pm 20,2^B$	$74,8 \pm 16,9^A$	$80,0 \pm 11,8^A$	$81,1 \pm 14,5^A$	$75,0 \pm 17,3$
PROG (%)	$35,7 \pm 16,4^B$	$46,5 \pm 15,3^A$	$47,9 \pm 14,2^A$	$49,2 \pm 13,5^A$	$44,8 \pm 15,6$
VAP (μ /s)	$88,4 \pm 9,8^A$	$85,1 \pm 8,5^A$	$84,3 \pm 10,7^A$	$89,6 \pm 11,7^A$	$86,8 \pm 10,3$
VCL (μ /s)	$134,5 \pm 12,8^A$	$128,9 \pm 12,7^A$	$126,2 \pm 16,0^A$	$132,9 \pm 16,4^A$	$130,6 \pm 14,7$
VSL (μ /s)	$79,2 \pm 9,7^A$	$76,7 \pm 8,3^A$	$75,9 \pm 10,3^A$	$80,8 \pm 11,1^A$	$78,1 \pm 10,0$
ALH (μ m)	$4,7 \pm 0,4^A$	$4,6 \pm 0,5^A$	$4,7 \pm 0,5^A$	$4,8 \pm 0,5^A$	$4,7 \pm 0,5$
** BCF (Hz)	$41,3 \pm 2,4^a$	$40,1 \pm 1,9^{ab}$	$38,6 \pm 3,2^{ab}$	$36,6 \pm 6,6^b$	$39,1 \pm 4,3$
STR (%)	$85,1 \pm 2,6^A$	$87,0 \pm 2,8^A$	$86,8 \pm 2,8^A$	$86,9 \pm 3,1^A$	$86,4 \pm 3,0$
LIN (%)	$57,8 \pm 3,8^A$	$59,9 \pm 4,6^A$	$59,9 \pm 3,4^A$	$60,4 \pm 5,2^A$	$59,5 \pm 4,4$

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste SNK.

** Valores seguidos por letras diferentes (a, b) sobrescritas na mesma linha diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste Kruskal-Wallis.

ÁLVAREZ *et al.* (2006) ao criopreservarem espermatozóides de jumentos da raça Zamorano-Leonés avaliaram diferentes concentrações de CLC / 120 x 10⁶ espermatozóides: 0 mg, 1,5 mg, 2,0 mg, 2,5 mg e 3 mg. As motilidade

espermática total e progressiva registradas foram respectivamente, 30, 41, 45, 42, 34% e 22, 33, 37, 33%. Os resultados de MOT e PROG obtidos no presente estudo foram superiores aos relatados pelos autores acima citado. Não foi observada uma queda nos parâmetros da motilidade com a adição de 3 mg de CLC, como relatado neste outro estudo. Segundo PURDY & GRAHAM (2004), o limite superior de adição de CLC para espermatozóides bovinos é de 6 mg / 120×10^6 de células, a partir desta quantidade o efeito passa a ser negativo para sobrevivência espermática (função da membrana é afetada). Possivelmente este valor limite para jumentos está acima de 3 mg / 120×10^6 de espermatozóides.

Para os valores de VAP, VCL, VSL e ALH não foram observadas diferenças entre tratamentos ($p > 0,05$). Estes valores foram inferiores aos registrados por ÁLVAREZ *et al.* (2006) e FLORES *et al.* (2008) após criopreservarem sêmen de jumentos de raças européias. No entanto, estes valores foram semelhantes aos registrados por OLIVEIRA *et al.* (2006) ao trabalhar na criopreservação de sêmen de jumento da raça Pêga. Tal fato sugere um efeito da raça nas características ligadas à velocidade e amplitude de deslocamento de cabeça (ALH) dos espermatozóides asininos criopreservados.

A variação na frequência do batimento flagelar (BCF) observada entre o grupo controle e o tratamento 3 pode estar ligada ao maior conteúdo de colesterol das células tratadas com 3 mg de CLC. Durante o processo de congelamento e descongelamento de sêmen as células espermáticas perdem quantidades de colesterol, fato que reduz a estabilidade das membranas, acelerando a capacitação espermática (IBORRA, *et al.*, 2000; MOORE *et al.*, 2005). Durante a capacitação ocorre a hiperativação espermática com aumento na frequência de batimento flagelar (THIBAUT *et al.*, 1993).

Os tratamentos não variaram quanto à retilinearidade (STR) e linearidade (LIN), não havendo influencia da incorporação de colesterol para estes parâmetros.

Os valores médios e desvios padrão para o percentual de espermatozóides asininos criopreservados reativos ao teste hiposmótico e supravital, para os diferentes tratamentos propostos, encontram-se sumariados na TABELA 6.

Tabela 6 – Médias e desvios padrão dos percentuais de espermatozóides asininos criopreservados reativos aos testes hiposmótico (HOST) e supravital (SV), em função dos tratamentos com diferentes quantidades de CLC.

Tratamento*	HOST (%)	Teste supravital (%)
0 mg	17,8 ± 9,1 ^B	32,5 ± 13,1 ^B
1 mg	32,6 ± 12,7 ^A	49,9 ± 12,5 ^A
2 mg	31,7 ± 13,7 ^A	55,6 ± 12,3 ^A
3 mg	32,9 ± 14,3 ^A	50,2 ± 15,6 ^A
Geral	28,7 ± 14,0	47,1 ± 15,8

* Tratamentos: CLC /120 x 10⁶ espermatozóides totais.

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si (P<0,05) pelo teste SNK.

A média de espermatozóides reativos ao HOST foi superior (P<0,05) para todos os tratamentos quando comparados ao grupo controle, não diferindo entre tratamentos. *ÁLVAREZ et al.* (2006) obtiveram médias de células reativas ao teste hiposmótico, após o descongelamento de espermatozóides asininos, semelhantes as do presente estudo, apenas para os tratamentos (0 mg CLC: 24%, 1,5 mg CLC: 31%, 2,0 mg CLC: 30% ,2,5 mg CLC: 28%, 3,0 mg CLC: 28%). Estes autores não observaram diferença (P>0,05) entre os grupos tratados com CLC e o grupo controle. *OLIVEIRA et al.* (2010) não observaram diferença entre células reativas ao HOST para grupos tratados ou não com CLC na criopreservação sêmen equino.

Os resultados do presente estudo sugerem que o uso de CLC mantém a funcionalidade da membrana plasmática, provavelmente por conservar melhor sua integridade durante procedimentos de criopreservação. Tais informações corroboram os achados de *MOORE et al.* (2005), que relataram um aumento na tolerância osmótica do espermatozóide equino criopreservados após adição de CLC.

As médias de espermatozóides não corados ao teste de coloração supra vital foram: 32,5%, 49,9%, 55,6% e 50,2%, para 0, 1, 2, 3 mg de CLC / 120 x 10⁶ de espermatozóides, respectivamente. Todos os tratamentos foram superiores ao controle (P<0,05) na manutenção da integridade da membrana plasmática. *FLORES et al.* (2008), trabalhando com sêmen congelado de jumento obtiveram uma média de 49,3% de células viáveis pelo SV. O sêmen fresco possuía uma média de 86,7% de células viáveis, sendo observado uma queda semelhante para a motilidade total.

Poucos estudos avaliaram o sêmen de jumento congelado pelo teste supravital. No presente estudo o SV se mostrou um teste eficiente na avaliação

da integridade da membrana plasmática, uma vez que as diferenças observadas para este teste foram confirmadas por outras avaliações como HOST e avaliação computadorizada da cinética espermática.

A TABELA 7 contempla as médias e desvios padrão percentuais de espermatozóides asininos criopreservados, tratado com diferentes concentrações de CLC, e submetidos a análise por sondas fluorescentes FITC-PNA/IP.

Tabela 7 – Médias e desvios padrão dos percentuais de espermatozóides criopreservados, após adição de diferentes concentrações de CLC, que apresentavam MIAI (membrana plasmática intacta e acrossoma intacto), MIAL (membrana plasmática intacta e acrossoma lesado), MLAI (membrana plasmática lesada e acrossoma intacto), MLAL (membrana plasmática lesada e acrossoma lesado) em teste com sondas fluorescentes do sêmen de jumentos raça Pêga.

Tratamento	MIAI **	MIAL **	MLAI	MLAL **
0 mg	17,7 ± 9,8 ^a	0,4 ± 0,2 ^a	70,1 ± 12,2 ^A	12,1 ± 13,1 ^a
1 mg	34,4 ± 14,3 ^a	0,3 ± 1,4 ^a	59,2 ± 13,0 ^B	6,1 ± 4,5 ^a
2 mg	31,8 ± 18,5 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	62,6 ± 16,5 ^{AB}	5,6 ± 4,0 ^a
3 mg	36,1 ± 13,5 ^a	0,2 ± 0,5 ^a	54,9 ± 14,6 ^B	8,7 ± 14,0 ^a
Geral	30,0 ± 15,9	0,1 ± 0,7	61,7 ± 15,0	8,1 ± 10,2

Valores seguidos por letras diferentes (A, B) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste SNK.

** Valores seguidos por letras diferentes (a, b) sobrescritas na mesma coluna diferem entre si ($P < 0,05$) pelo teste Kruskal-Wallis.

As médias e desvios padrão de MIAI registrados no presente estudo foram 17,7 ± 9,8%, 34,4 ± 14,3%, 31,8 ± 18,5%, 36,1 ± 13,5% para os tratamentos com 0, 1, 2 e 3 mg de CLC / 120×10^6 de células, respectivamente. Não foi observada diferença ($P > 0,05$) para MIAI entre os tratamentos. As médias registradas no presente estudo foram semelhantes às relatadas por ÁLVAREZ *et al.* (2006) em estudo do efeito de diferentes concentrações de CLC. No entanto, estes autores observaram diferenças entre os grupos avaliados ($P < 0,05$), onde os tratamentos com 2 e 2,5 mg de CLC para 120×10^6 células foram superiores ao controle. Apesar da semelhança entre os valores, ao se avaliar os desvios padrão, observa-se menor variação experimental para o estudo destes autores, fato que pode ter contribuído para verificação de efeito entre tratamentos. A utilização de 3 jumentos, o número maior de coletas de cada jumento (9 coletas) e a utilização de sistemas de resfriamento automatizados podem ter contribuído para esta menor variação experimental.

Outros estudos têm observado aumento na integridade da membrana plasmática e/ou do acrossoma quando da utilização de CLC em garanhões (COMBES *et al.*, 2000; ZAHN *et al.*, 2002; MOORE *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*,

2010; SPIZZIRI, *et al.*, 2010), bovinos (PURDY & GRAHAM, 2004; MOCÉ & GRAHAM, 2006; MORAES *et al.*, 2010) e suínos (GALANTINO-HOMER *et al.*, 2006).

A figura 6 ilustra a variação da motilidade total de espermatozóides asininos tratados com diferentes concentrações de CLC, durante incubação a 37°C para o teste de termo resistência (TTR).

As médias e desvios padrão da motilidade total observada para os tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min. foram, respectivamente, 50,4 ± 13,1%, 44,8 ± 13,9%, 41,4 ± 13,2%, 32,6 ± 14,5% e 26,8 ± 16,1% para o grupo controle (0 mg CLC / 120 x 10⁶ de sptzs.); 54,6 ± 7,6%, 50,8 ± 9,5%, 45,6 ± 12,9%, 39,8 ± 15,2% e 33,4 ± 17,2 para o tratamento 1 (1 mg CLC / 120 x 10⁶ de sptzs.); 56,8 ± 9,1%, 53,0 ± 10,1%, 46,6 ± 11,7%, 41,4 ± 14,0% e 36,0 ± 13,4% para o tratamento 2 (2 mg CLC / 120 x 10⁶ de sptzs.); 55,0 ± 10,3%, 50,6 ± 8,8%, 47,3 ± 9,3%; 40,0 ± 11,6% e 35,2 ± 11,3% para o tratamento 3 (3 mg CLC / 120 x 10⁶ de sptzs.).

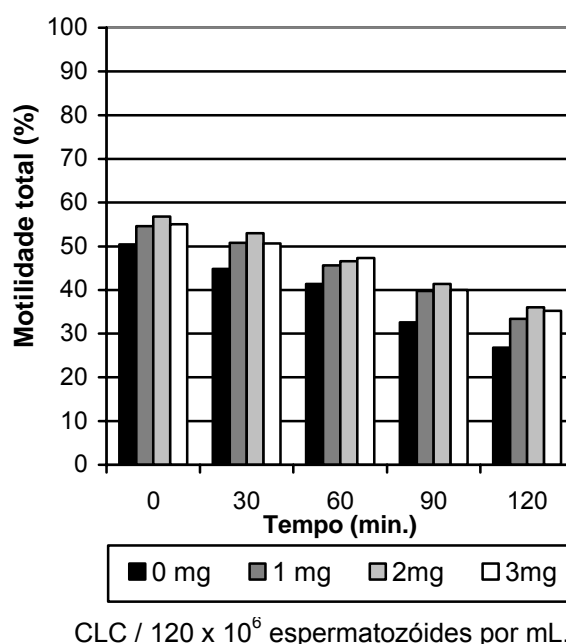
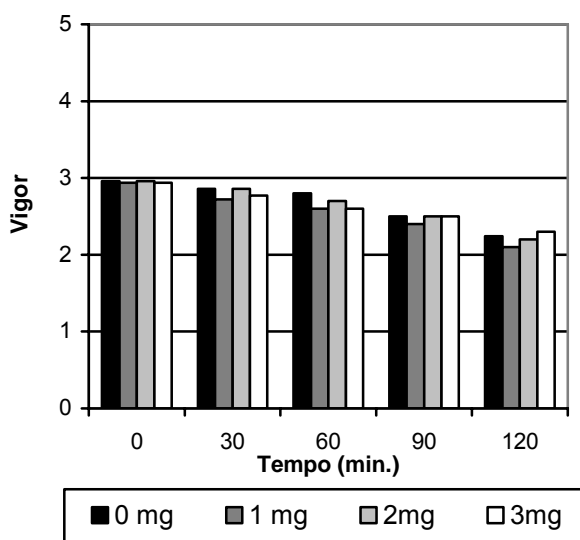


Figura 6: Motilidade total em diferentes tempos do sêmen de jumentos da raça Pêga descongelado e incubado a 37°C por 120 minutos, para os diferentes tratamentos com CLC (P>0,05).

A figura 7 ilustra a variação no vigor de espermatozóides asininos tratados com diferentes concentrações de CLC, durante incubação a 37°C para TTR.

As médias e desvios padrão do vigor observado para os tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min. foram, respectivamente, $2,9 \pm 0,2$, $2,8 \pm 0,3$, $2,8 \pm 0,3$, $2,5 \pm 0,4$ e $2,2 \pm 0,6$ para o grupo controle (0 mg CLC / 120×10^6 de sptzs.); $2,9 \pm 0,2$, $2,7 \pm 0,3$, $2,6 \pm 0,4$, $2,4 \pm 0,5$ e $2,1 \pm 0,4$ para o tratamento 1 (1 mg CLC / 120×10^6 de sptzs.); $3,0 \pm 0,2$, $2,9 \pm 0,3$, $2,7 \pm 0,3$, $2,5 \pm 0,3$ e $2,2 \pm 0,4$ para o tratamento 2 (2 mg CLC / 120×10^6 de sptzs.); $2,9 \pm 0,2$, $2,8 \pm 0,3$, $2,6 \pm 0,3$, $2,5 \pm 0,4$ e $2,3 \pm 0,4$ para o tratamento 3 (3 mg CLC / 120×10^6 de sptzs.)



CLC / 120×10^6 espermatozóides por mL.

Figura 7: Vigor em diferentes tempos do sêmen de jumentos da raça Pêga descongelado e incubado a 37°C por 120 minutos, para os diferentes tratamentos com CLC ($P > 0,05$).

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos para os parâmetros motilidade total e vigor do sêmen asinino descongelado, após 120 min. de incubação a 37°C. O TTR vem sendo recomendado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) como teste complementar para avaliar o sêmen das diferentes espécies de animais. A falta de padronização deste teste para espécie equina e a carência de resultados na literatura para sêmen congelado de jumentos limita a comparação com outros estudos.

Ao avaliar a longevidade do sêmen de um jumento da raça Pêga pelo TTR, KER *et al.* (2010) observaram uma queda lenta da motilidade. A motilidade inicial (0 min.) média foi $36,1 \pm 6,5\%$ e final (90 min.) foi $30,0 \pm 7,1\%$. Queda semelhante foi observada no presente estudo, sendo justificada pelas lesões oriundas do

congelamento-descongelamento e/ou pelo efeito das altas concentrações de glicerol no meio diluidor cujo sêmen permaneceu incubado. Apesar dos efeitos benéficos do glicerol durante a criopreservação, este, apresenta certa toxicidade para espermatozóides asininos (VIDAMENT *et al.*, 2009). A queda nos parâmetros físicos observada durante o TTR para jumentos é mais lenta que para garanhões, provavelmente devido às características estruturais inerentes a cada espécie (MANN *et al.*, 1963).

SILVA *et al.* (1997) observaram motilidade progressiva de 20,9% e 21,6% após 120 min. do TTR ($P > 0,05$), para espermatozóides de jumentos criopreservados em macrotubos e tubos de alumínio, respectivamente.

MOCÉ *et al.* (2010) avaliaram diferentes tipos de ciclodextrinas (concentração $\times 10^6$ espermatozóides por mL) para preservar espermatozóides de carneiros. Foi observada maior motilidade total para espermatozóides criopreservados após a incorporação de 2 mg de colesterol a 2-hidroxi-propil- β -ciclodextrina (45%), quando comparado ao grupo que não recebeu CLC (26%) e ao grupo criopreservado com 2 mg de colesterol incorporado a metil- β -ciclodextrina (29%). As células foram incubadas a 38,5°C por 3 horas.

VIANA (2004) não observou correlação entre a porcentagem de espermatozóides móveis pós-teste de termo resistência rápido e lento com os índices de fertilidade pós inseminação artificial em bovinos. Tais achados podem estar relacionados à própria metodologia empregada na realização do TTR, submetendo as amostras seminais a condições “antifisiológicas”, representadas pelo estresse térmico (46°C) e osmótico (osmolaridade acima de 1000mOsm/L determinada pelo uso do crioprotetor glicerol) não representativos das reais condições encontradas pelas células espermáticas no trato reprodutor feminino.

A natureza subjetiva da avaliação adotada para o teste no presente estudo, somado às condições não fisiológicas do teste, podem ter limitado a observação de diferenças entre os tratamentos. Tal fato foi observado no presente estudo na avaliação subjetiva da motilidade total do sêmen descongelado. Variações provenientes da avaliação subjetiva podem limitar a visualização de respostas experimentais (VERSTEGEN *et al.*, 2002).

Tabela 8: Correlação Simples de Pearson entre a MOT (motilidade total – CASA), PROG (motilidade progressiva – CASA), HOST (células reativas ao teste hiposmótico, SV (células não coradas ao teste supravital) e MIAI (células com membrana intacta e acrossoma intacto por teste com sondas fluorescentes) do sêmen congelado/descongelado de jumentos da raça Pêga.

Parâmetros	PROG	HOST	SV	MIAI
MOT	0,88**	0,25**	0,32**	0,35**
PROG	1	0,21*	0,39**	0,41**
HOST	-	1	0,41**	0,28**
SV	-	-	1	0,37**
MIAI	-	-	-	1

*(P<0,05) **(P<0,01),.

Os resultados da correlação entre os testes avaliados foram de alta, média ou baixa magnitude, e foram positivas. Para correlação alta, consideraram-se valores de 0,66 a 0,99; para média, valores de 0,33 a 0,65 e para baixa, menos de 0,33. Foi observado correlação (P<0,05) entre todas as características avaliadas.

A alta correlação positiva observada entre motilidade total e progressiva era um fato esperado. A PROG faz parte da MOT, logo a redução ou aumento de PROG influencia reduzindo ou aumentando, respectivamente, a MOT.

Houve baixa correlação observada entre MOT e PROG, e HOST. Trabalhando com a mesma metodologia do HOST que a utilizada no presente estudo, CANISSO (2008a) verificou correlação média ($r = 0,52$), com motilidade progressiva, para sêmen congelado de jumentos da raça Pêga. Ao avaliar o sêmen asinino em diferentes etapas do processo de criopreservação este autor concluiu que devido à inconstância de resultados o HOST não é um teste adequado para avaliar o sêmen congelado de jumentos.

MELO (1999) ao avaliar diferentes osmolaridades e solutos na realização do HOST para ganhões, relatou alta repetibilidade inter ensaio quando da utilização de solução de sacarose 100 mOsmol/L. Esta autora relatou uma alta correlação (0,68) entre HOST e a motilidade total.

Outros estudos têm variado no tipo de solução utilizada e no tempo de incubação com o sêmen. Existe a necessidade de padronizar o teste para espécie asinina. A correlação positiva com os demais testes utilizados no presente estudo e os resultados obtidos mantêm o teste hiposmótico como uma ferramenta

complementar que pode somar informações na avaliação do sêmen asinino. A correlação entre o teste de coloração supravital com PROG e HOST foram consideradas médias ($r = 0,39$ e $r = 0,41$). FÜRST (2002) relatou maior quantidade de células vivas (não coradas) ao SV que na motilidade total na avaliação do sêmen congelado de garanhões. Em estudo que correlaciona a coloração supravital com PROG, CANISSO (2008a) relata uma baixa correlação ($r = 0,12$) entre estes parâmetros. Este autor credita a estes resultados uma falha na metodologia empregada para o teste na avaliação do sêmen asinino criopreservado, não sendo possível utilizar a correlação deste autor entre HOST e SV para comparar com os resultados obtidos no presente estudo. FLORES *et al.* (2008) apesar de não correlacionarem os valores de MOT e SV, obtiveram valores de queda semelhantes para do sêmen fresco para o sêmen congelado-descongelado de jumentos. A MOT foi de 83,6% para 48,4%, após o descongelamento e as células não coradas foram de 86,7% para 49,3%. MELO & HENRY (1999) evidenciaram uma alta correlação ($r = 0,75$, $P < 0,05$) para o sêmen equino fresco entre a motilidade total e o percentual de espermatozoides não corados (vivos) pela SV. JOHANSSON *et al.* relataram valores semelhantes para o sêmen fresco de garanhões ($r = 0,72$, $P < 0,01$).

O teste de coloração supravital se mostrou um teste de fácil realização, podendo ser realizado para análises seminais. As correlações entre a integridade da membrana plasmática e acrossomal com MOT e PROG e SV foram médias. Não foram encontrados estudos que correlacionassem estes parâmetros para espécie asinina.

LOVE *et al.* (2003) utilizaram o iodeto de propídio, e o SYBR-14 em associação com o JC-1 (avalia funcionalidade mitocondrial), para avaliação da integridade de membrana do sêmen de garanhões diluídos com o EZ-Mixin[®] e resfriados no Equitainer[®] por 24 horas. Esses autores adicionaram diversas proporções de espermatozoides mortos para a avaliação e comprovação destas duas técnicas e verificaram alta correlação ($r=0,98$); entre a motilidade total avaliada pelo sistema CASA e a integridade de membrana avaliada por auxílio da citometria de fluxo. KUISMA *et al.* (2006) também verificaram correlação entre a técnica do CFDA/PI e a de motilidade progressiva. PUGLIESI (2009) não observou correlação entre motilidade total e espermatozoides íntegros na

avaliação em microscopia de epifluorescência de espermatozóides de garanhões resfriados em dois diluidores.

Os testes complementares, mesmo que avaliem a mesma estrutura, como no caso do HOST, SV e teste com sondas fluorescentes, que avaliam a membrana plasmática, as avaliações se dão por diferentes interações entre reagentes e células. Desta forma, cada teste avalia uma resposta característica, não necessariamente se correlacionando de forma alta com outro teste. A importância dos testes complementares está no caráter somatório de informações, sendo necessário apenas uma maior padronização dos testes para comparações mais fidedignas.

Não foram encontrados estudos que verifiquem o efeito da incorporação de CLC na fertilidade do sêmen asinino criopreservado. A presença de poucos estudos, inclusive para outras espécies (PURDY & GRAHAM, 2004; ZAHN *et al.*, 2005; SPIZZIRI *et al.*, 2010) e os resultados contraditórios impedem conclusões sobre o assunto, sendo um importante tema a ser pesquisado.

5- CONCLUSÕES

- A incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoides asininos aumenta resistência desta estrutura ao processo de criopreservação, mantendo sua viabilidade e integridade funcional após o congelamento/descongelamento.
- A concentração de 1 mg de colesterol incorporado a ciclodextrina para 120×10^6 espermatozoides totais se mostrou a mais adequada do ponto de vista econômico.
- A incorporação de colesterol a membrana plasmática aumenta o percentual de células apresentando motilidade total e progressiva.
- Os testes de viabilidade pós-descongelamento, apresentam caráter complementar na avaliação do sêmen asinino congelado, e devido à inexistência de um teste para predição da fertilidade, é possível que um maior número de testes complementares possa representar melhor a resposta pontual sobre a qualidade de amostras seminais.

- A avaliação computadorizada do movimento espermático é uma importante ferramenta na experimentação animal, reduzindo erros provenientes de variações individuais que ocorrem na avaliação subjetiva.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R. J.; SUTTON, M.; WARNER, P.; RICHARDSON, D. W. Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 73, p. 441-449, 1985.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS et al. Organização interna da célula: Estrutura da membrana. **In: Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, Cap. 10, p. 583-595, 2004.
- ALVARÉZ A. L.; SERRES, C.; TORRES, P.; et al. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 89-91, 2006.
- ALVAREZ, A.L., TORRES, P., SERRES, C., MATEOS, E., GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on cooled semen from Zamorano- Leones donkey. **Rep. Domest. Anim.** 40, 375 (Abstract P134), 2005.
- AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. **In: McKINNON, A.O., OSS, J.L. (Eds.), Equine reproduction**. Malvern: Lea & Fabiger, p.715-45, 1993.
- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.
- AMORIM, E. A. M. Alterações da membrana espermática de suínos, bovinos e eqüinos na qualidade do sêmen. Viçosa, 2008. Tese – **Universidade Federal de Viçosa**, 2008a.
- AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.D.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering Cholesterol or Desmosterol to Bull Sperm Membranes Improves Cryosurvival. **34th Annual Conference of the International Embryos Transfer Society (IETS)**, Proceedings The Journal Reproduction, Fertility & Development, January 5-9, Denver – CO – EUA, 2008b.

- AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.K.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M.; AMORIM, L.S.; TORRES, C.A.A. The effect of adding cholesterol, vitamin A, cod liver or flax oil loaded-cyclodextrin on bull sperm cryosurvival. **16th International Congress on Animal Reproduction** – ICAR, Budapest – Hungary, 2008c.
- AMORIM, E.A.M.; GRAHAM, J.D.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M.; AMORIM, L.S.; TORRES, C.A.A. The Effect of Adding Cholesteryl-Heptanoate, -Palmitate, -Pelargonate, or -Stearate Loaded Cyclodextrin on Bull Sperm Cryosurvival. **40th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR)**, Proceeding 40th Annual Meeting of the SSR, July, San Antonio – TX – EUA, 2007.
- AMORIM, E. A. M.; GRAHAM, J. K.; SPIZZIRI, B.; MEYERS, M.; TORRES, C. A. A. Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, 2009 (In press).
- ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; BARBOSA, R.T.; MANZANO, A. Congelação do sêmen de jumentos: características reprodutivas de um doador. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** (Supl. 1), p. 215, 1989.
- ARRUDA, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). São Paulo: Departamento de Reprodução Animal – **Universidade de São Paulo**, 2000. 120p. Tese (Tese de Livre Docência em Reprodução Animal) FMVZ – Universidade de São Paulo, 2000.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Sci Vet Supl**, v.31, p.230-231, 2003.
- ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; MANZANO, A. Inseminação artificial de eqüídeos com sêmen congelado em palhetas de 0,5 ml. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 20., 1986, Cuiabá. Anais...Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso, p.181, 1986.
- ARRUDA, R. P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Sci Vet Supl**, v.31, p.226- 227, 2003.
- ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.1, p.8-16, jan./mar. 2007.
- ASHWOOD-SMITH, M.J.. Mechanisms of cryoprotectant action. In: **Bowler K, Fuller B.J., eds. Temperature and cells**. Cambridge: The Co. of Biologists Ltd.: 395-406, 1987.
- ATGER, V.M.; DE LA LLERA MOYA, M.; STOUTD, G.W.; RODRIGUEZ, W.V.; PHILLIPS, M.C.; ROTHBLAT GH. Cyclodextrins as catalysts for the removal of cholesterol from macrophage foam cells. **J. Clin. Invest**. 99:773-780, 1997.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, n.3-4, p. 268-275, 2008.

- BARRERA-COMPEAN, M.H.; PURDY, P.H.; DZAKUMA, J.M.; NEWTON, G.R.; NUTI, L.C. Cholesterol-loaded cyclodextrins improves post-thaw goat sperm motility. **Journal of Animal Science** 83(Suppl.1):153, 2005.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames, IA: Iowa University Press, 1989. 285p.
- BLOM, E. A one-minute live-dead sperm stain by means of eosin-nigrosin. **Fétil Steril.** 1:176-177, 1950.
- BLOM, E., 1973. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, p. 383-391, 1973.
- BUTLER, W. J.; ROBERTS, T. K. Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43, n. 11, p. 183-187, 1975.
- CANISSO, I. F. Comportamento sexual, parâmetros seminais e fertilidade do sêmen congelado de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga. Tese. **Universidade Federal de Viçosa**, 189 p., 2008a.
- CANISSO, I. F.; CARVALHO, G. R.; DAVIES MOREL, M. C. G.; *et al.* Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga donkeys (*Equus asinus*) mounting estrous horse mares (*Equus caballus*). **Theriogenology**, v. 73, p. 56-63, 2010.
- CANISSO, I. F., SOUZA, F. A., CARVALHO, G. R. *et al.* Alguns aspectos fundamentais do exame clínico andrológico de jumentos (*Equus asinus*) Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 233-239, 2008b.
- CASEY, P. J.; HILLMAN, R. B.; ROBERTSON, K.R.; YUNDIN, A.I.; LIU, I. K. M.; DROBINS, E. Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **J Androl**, v.14, p.289-297, 1993.
- CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; SOUZA, L. W. O.; RODRIGUES, P. H. M.; ARRUDA, R.P. Uso de CMXRos e JC-1 na avaliação da função mitocondrial, associadas a sondas fluorescentes para avaliação da membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides bovinos. **Acta Sci Vet Supl**, v.33, p.321, 2005.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. ANDRADE, A. F.C. *et al.* Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 1-10, 2007.
- CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality e lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**. 121(3):395-401, 2001.
- CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.*et al.* Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 6, n. 2, artigo n. 43, 2005.
- CHANDLEY, A.C. Meiotic studies and fertility in human translocation carriers. In **Daniel, A. (ed.), The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements**. A.R.Liss, New York, pp. 361–382, 1988.

- CHOI, Y.H.; TOYODA, Y. Cyclodextrin removes cholesterol from mouse sperm e induces capacitation in a protein free medium. **Biol Reprod.** 59:1328-1333, 1998.
- CHRISTIAN, A.E.; HAYNES, M.P.; PHILLIPS, M.C.; ROTHBLAT, G.H. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. **J. Lipid Res.**, 38:2264-2272, 1997.
- CNA. Estudo do complexo do agronegócio cavalo no Brasil: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada ESALQ-USP/Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil, 70p, **Coletânea Estudos Gleba**, 40, 2006.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 2ed. Belo Horizonte, MG, 1998. 54p.
- COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; SCHROEDER, F.; BURGHARDT, R.C.; BLANCHARD, T.L. Effect of cholesterol on the motility e plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** 56:127-132, 2000.
- COSTA, A.J.S.A. Avaliação clínico andrológica do jumento da raça Pêga. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – **Universidade Federal de Minas Gerais**, 1991. 66p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária - UFMG, 1991.
- COCHRAN, J. D.; AMANN, R. P.; FROMAN, D. P. et al. W. Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5 °C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. **Theriogenology**, v. 22, n. 1, p. 25-38, 1984.
- CROSS, N. L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 7-11, p. 7-11, 1998.
- CROSS, N.L. Effect of methyl-beta-cyclodextrin on the acrossomal responsiveness of human sperm. **Mol Reprod Dev.** 53:92-98, 1999.
- CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET, J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. **Gamet Research**, 15:213-226, 1986.
- CULLIS, P.R.; HOPE, M.J. Physical properties e functional roles of lipids in membranes. **In: Biochemistry of lipids e membranes** (D.E. Vance e J.E. Vance Eds.) Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA pp.25-72, 1985.
- DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**. V. 49, p. 831-41, 1997.
- DAVIS, B. K. Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. **In: Symposium on the pharmacological effects of lipids.** AOCS Monograph n. 5, p. 145-157, 1978.
- DAVIES MOREL, MCG. **In: Equine Artificial Insemination.** Wallingford-Oxon: CAB International, 406p, 1999.
- DENNISTON, D. J.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. et al. The effects of liposomes composed of phosphatidylserine and cholesterol on fertility rates using frozen-thawed equine sperm. **Journal of Equine Veterinary**, v. 17, n. 12, p. 675-676, 1997.

- DOTT, H.M. Morphology of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.23, p.41-46, 1975.
- DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.A. field study of the fertility of transported equine semen, **Theriogenology**, v. 22, p. 291-303, 1984.
- DUNCAN, A. E.; WATSON, P. F. Predictive water loss curves for ram spermatozoa during cryopreservation: comparison with experimental observation. **Cryobiology**, v. 29, p. 95-105, 1992.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **In: Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza: Acribia, 192 p., 1990.
- FARREL, P. B.; PRESICCE, G. A.; BROCKETT, C. C.; FOOTE, R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, p. 871-879, 1998.
- FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; Graham, J.K.; Squires, E.L. Assessment of Pisum sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Mol Reprod Dev**. 32(1):23-7, 1992.
- FENEUX, D.; SERRES, C.; JOUANNET, P. Sliding spermatozoa: a dyskinesia responsible for human infertility? **Fertility and Sterility**, v. 44, p. 508–511, 1985.
- FERREIRA, M.F.L. Efeito de diluente e taxa de resfriamento sobre a motilidade espermática e a fertilidade do sêmen de jumento (*Equus asinus*). Belo Horizonte: Escola de Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, 1993. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) **Escola de Veterinária – UFMG**, 1993.
- FLORES, E.; TABERNER, E.; RIVERA, M.M.; PENA, A.; RIGAU, T.; MIRO, J.; Rodriguez-Gil, J.E. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. **Theriogenology**, v. 70, p.936-945, 2008.
- FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; MAFFILI, V.V.; BORGES, A.M.; SANTOS, A.D.F.; RODRIGUES, M.T.; OLIVEIRA, R.F.M. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**. V.2.,n.2., p.139-144, 2005.
- FÜRST, R. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas nas fertilidade do sêmen equino. Viçosa: Departamento de Zootecnia – **Universidade Federal de Viçosa**, 2006, 96p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – DZO-UFV, 2006.
- FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; Efeito do resfriamento do sêmen sobre sua congelabilidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.5,p.599-607,2005.
- GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.; STOUT, T.A.; COLENBREER, B. Capacitation e the acrosome reaction in equine sperm. **Anim Reprod Sci**. 68(3-4):249-65, 2001.
- GALANTINO-HOMMER, H. L.; ZENG, W-X.; MEGEE, S. O. et al. Effects of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 5, p. 638-650, 2006.

- GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. A. et al. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analysis. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.
- GARNER, D.L .; THOMAS, A. C.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biol Reprod**, v.57, p.1401-06, 1997.
- GARNER, D.L .; THOMAS, A. C.; GRAVANCE, C. G. The effect of glycerol on he viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reprod Domest Anim**, v.34, p.399-404, 1999.
- GASTAL, M.M.F.O. Estudo das características seminais e do comportamento sexual de jumentos. Belo Horizonte: Escola de Veterinária – **Universidade Federal de Minas Gerais**, 1991. 105p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Escola de Veterinária - UFMG, 1991.
- GEBERS, A. M. Emissão diária de espermatozóides e algumas características reprodutivas de jumentos da raça Pêga. Viçosa: Departamento de Zootecnia – **Universidade Federal de Viçosa**, 1995. 90p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) DZO – UFV, 1995.
- GLAZAR, A. I., MULLEN, S. F. LIU, J., *et al.* Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*, v. 59, p. 201-206, 2009.
- GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. **Anim Reprod Sci** 68:239–247, 2001.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America - Equine practice**, v.12, p.131-147, 1996.
- GRAHAM, J.K., FOOTE, R.H., HOUGH, S.R. Penetration of zona-free hamster eggs by liposome-treated sperm from the bull, ram, stallion, e boar. **Biol Reprod**. 37(1):181-8, 1987.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, e mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, 43:55-64, 1990.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America - Equine practice**, v.12, p.131-147, 1996.
- GRAHAM, J.K. Sperm physiology: response to freezing & analysis of sperm function. **In: ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY**, 1996, Proceedings.... Society for Theriogenology, p.54-9, 1998.
- GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effects of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull sperm after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, n. 1, p. 42-52, 1987.
- GRAZAR, A. A.; MULLEN, S. F.; LIU, J.; *et al.* Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*, v. 59, p. 2001-206, 2009.

- HAFEZ, B.; HAFEZ, E, S. E. In: **Reprodução Animal**. 7.ed. Barueri: Manole, p.513, 2004.
- HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. **Arch Exp Vet Med**, v.38, p.105-114, 1984.
- HANCOCK, J. L. A staining technique for the study of temperature-shock in semen. **Nature**, v.24, p.323-324, 1951.
- HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, n. 1,p. 343-352, 1990.
- HEITLAND, A. V.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K. et al. Motility and fertility of stallion sperm cooled and frozen in a modified skim milk extender containing egg yolk and liposome. **Biology of Reproduction Monograph**, v. 1, p. 753-759, 1995.
- HENRY, M.; OLIVEIRA, M.M.F.; DIAZ, A.P.; GASTAL, E.L.; TOLENTINO, F.T. Características do sêmen de jumentos da raça Nordestina. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 7., 1987, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p. 72.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p.3–22, 2000.
- HOLT, W. V.; HEAD, M. F.; NORTH, R. D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1089-1094, 1992.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. **Journal Experimental Zoology**, v. 230, n. 3, p. 473-483, 1984.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Thermotropic phase transitions in plasma membrane of ram spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 447-457, 1986.
- HOLT, W. V.; NORTH, R. D. The role of membrane-active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage. **Gamete Research**, v. 19, n. 1, p. 77-89, 1988.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p.3–22, 2000.
- HU, J.; ZHEN, T.; LI, S.; LIU, B. The effect of cyclodextrins on polymer preparation. **Journal of Materials Science**. 40(23):6057-6061, 2005.
- IBORRA, A.; COMPANYÓ, M.; MARTÍNEZ, P. et al. Cholesterol efflux promotes acrosome reaction in goat spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 378-383, 2000.
- JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER,W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 37, p.1241–1252, 1992.

- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VER, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. *et al*, Development of an assay to test the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.70, p.219-228, 1984.
- JOHANSSON, C. S.; MATSSON, F. C.; LEHN-JENSEN, H.; NIELSEN, J. M.; PETERSEN, M. M. Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin–nigrosin stain. **Animal Reproduction Science**, (Abstracts), 2008.
- JOSHI, N. *et al*. Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by atomic force microscopy. **Fertility and Sterility**, v.75, n.5, p.961-66, 2001.
- KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K.; SQUIRES, E.L.; JASKO, D.J.; PICKETT, B.W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38,n.4,p.601-614, 1992.
- KEITH, S.L. Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa. Fort Collins, Colorado, USA: **Colorado State University**, 1998. 104p. Thesis (Master of Science), CSU, 1998.
- KER, P. G. Fertilidade do sêmen congelado de Jumento da Raça Pêga em éguas inseminadas antes e após a detecção da ovulação. Tese de mestrado. **Universidade Federal de Viçosa**, 2010.
- KER, P. G., PUGLIESI, G., MARTINS, L. F., OLIVEIRA, R. R., *et al*. Criopreservação de sêmen asinino: uma análise laboratorial. In: Anais II **Simpósio mineiro de Equideocultura**, Viçosa, 2009.
- KIRK, E.S. *et al*. Comparison of *in vitro* laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.64, p.1422-1439, 2005.
- KLEIN, U.; GIMPL, G.; FAHRENHOLZ, F. Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with b-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. **Biochem**, 34:13784–13793, 1995.
- KREUCHAUF, A. Reproductive physiology in the jackass. **Animal Research Development**. v.20, p.51-78, 1984.
- KUISMA, P.; ANDERSSON, M.; KOSKINEN, E.; KATILA, T. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.48, n.14, 2006.
- LANGE, Y.; YE, J.; THEODORE, L. S. How cholesterol homeostasis is regulated by plasma membrane cholesterol in excess of phospholipids. **PNAS**, v. 101, n. 32, 2004.
- LEITE, S. V. F. Influência do número de espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) sobre a taxa de prenhez em éguas (*Equus caballus*) inseminadas à fresco. Belo Horizonte: **UFMG. Escola de Veterinária**, 52 p., tese mestrado, 1994.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L., COX, M. Lehninger. In: **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 839 p., 2006.

- LOOMIS, P.R.; SQUIRES, E.L. Frozen semen management in equine breeding programs, **Theriogenology**, v. 64, p. 480-491, 2005.
- LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; BRINSKO, S. L.; RIGBY, R. S.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 58, p. 221-224, 2002.
- LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L.; BLANCHARD, T. L.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. **Theriogenology**, v.60, p.1127-1138, 2003.
- MAGISTRINI, M. Semen evaluation. In: **SAMPER, J.C. (Ed.) Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. 1ed. Philadelphia: WB Saunders, p. 91-108, 2000.
- MANN, T.; MINOTAKIS, C.S.; POLGE, C. Semen composition and metabolism in the stallion and jackass. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.5, p. 109- 22, 1963.
- MARTIM, JC, KLUG E, GUNZEL AR. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal of Reproduction and Fertility**, (Suppl.) v. 27. p 47-51, 1979.
- MATTOS, R. C.; MALSCHITZKY, E.; CASTILHO, L. F. F.; et al. Efeito de diferentes diluentes na sobrevida de espermatozoides equinos in vitro. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 10, 1993, Belo Horizonte, Anais..., v. 2, p. 325, 1993.
- MAO, J.; WU, G.; PRATHER, R. S.; SMITH, M. F.; et al. Effect of methyl- β - cyclodextrin treatment of pig spermatozoa on in vitro fertilization and embryo development in the absence or presence of caffeine. **Theriogenology** 64, p. 1913–1927, 2005.
- MAXWELL, W. M. C.; WELCH, G.R. JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reprod Fertil Dev**, v.8, p.1165-1178, 1997.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology**, v. 247, n.16, p.125-142, 1984.
- MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. **Proc qth Int. Congr. Amim, Reprod**. And I.2, p. 99-114, 1980.
- MEDINA, V. H. Uso de sondas fluorescente na avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos recém colhidos e submetidos a congelação. Jaboticabal, 1995. 89p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, **Universidade Estadual Paulista**, 1995.
- MEIRELLES L. S., MALSCHITSKY, E., NEVES, A. P., *et al.* Leite em pó desnatado não inativado e leite desnatado UHT para preservação e fertilidade do sêmen equino resfriado. **Ciência Rural**, v. 28, n.3, p. 467-470, 1998.
- MELO, M.I.V; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.71-78, 1999.

- MELO, M.I.V., HENRY, M., BEKER, A.R.C.L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen eqüino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n.6,p.757-763,2005.
- MESEGUER, M.; GARRIDO, N.; MARTINEZ-CONEJERO, J. A.; SIMON, C.; PELLICER, A.; REMOHI, J. Role of cholesterol, calcium, and mitochondrial activity in the susceptibility for cryodamage after a cycle of freezing and thawing. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 3, p. 588-594, 2004.
- MIRÓ, J., LOBO, V., QUINTERO-MORENO, A., MEDRANO, A., PENA, A., RIGAU, T. Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. **Theriogenology** 63, 1706–1716, 2005.
- MOCÉ, E., GRAHAM, J.K. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival **J. Anim. Sci.**, v.84, p.826–833, 2006.
- MOCÉ, E., PURDY, P. H., GRAHAM, J. K. Treating ram sperm with cholesterol loaded cyclodextrins improves cryosurvival. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 118, p. 236-247, 2010.
- MOORE, A.I., SQUIRES, E.L., GRAHAM, J.K. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. **Cryobiology**, v.51, p.241–249, 2005.
- MORAES, E. A., GRAHAM, J. K., TORRES, C. A. A., *et al.* Delivering cholesterol or cholestanol to bull sperm membranes improves cryosurvival. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 118, p. 148-154, 2010.
- MORAES, E. A., TORRES, C. A. A., ROMUALDO, P. L., GRAHAM, J. K. Delivering cholesterol to boar sperm membranes improve cryosurvival. **Cryobiology**, v. 59, p. 416, (abstract) 2009.
- MORAIS, R.N. Contribuição ao estudo da biologia reprodutiva de jumentos (*Equus asinus*). São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – **Universidade de São Paulo**, 1990. 105p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – FMVZ –USP, 1990.
- MORAIS, R.N.; MUCCILOLO, R.G.; VIANNA, W.G. Biologia reprodutiva de jumentos. I Biometria testicular e comportamento sexual durante a coleta de semen. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 30, n. 1 p. 47-50, 1993.
- 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, n.6., p. 999-1012, 1992.
- MORRIER A., BAILEY, J. L. Cholesterol loaded methyl-b-cyclodextrin protects ram sperm during cryopreservation and cold-shock. **Theriogenology**, v. 63, p. 423-424, abstract, 2005.
- MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v. 3, n. 5, p. 403-439, 1997
- MORTIMER, S. T.; MAXWELL, W. M. C. Effect of medium on the kinematics of frozen–thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p. 285–291, 2004.

- MORTIMER, D.; PANDYA, I. J.; SAWERS, R. S. Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 93–102, 1986.
- NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial em diferentes concentrações e volumes de espermatozoides criopreservados eqüino. **Acta Sci Vet Supl**, v.33, p.298, 2005.
- NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p.721-727, 1999.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. In: **Lehninger – Principles of Biochemistry**, 3rd Edition, North Publ., NY, 2000.
- NISHIKAWA, Y. In: **Studies on reproduction in horses**. Tokyo: Japan Racing Assoc. 340p, 1959.
- NUNES, R. O Jumento Pêga. In: **SIMPÓSIO MINEIRO DE EQUIDECULTURA**, 1., 2007, Viçosa. Anais... Viçosa: Departamento de Zootecnia- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 33-39, 2007.
- OHVO, H., OLSIO, C., SLOTTE, J.P. Effects of sphingomyelin e phosphatidylcholine degradation on cyclodextrin-mediated cholesterol efflux in cultured fibroblasts. **Biochimica Biophysica Acta**. 1349:131-141, 1997.
- OLIVEIRA, J. V.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; et al. Effect of cryoprotectant on donkey sêmen freezability and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 82-84, 2006.
- OLIVEIRA, C. H.; VASCONCELOS, A. B.; SOUZA, F. A.; et al. Cholesterol addition protects membrane intactness during cyopreservation of stallion sperm. **An. Reprod. Sci.**, v. 118, p. 194-200, 2010.
- PAPA, F.O.; MARTIN, J.C.; KRAUSE, A. Influência da centrifugação sobre a motilidades do sêmen de eqüinos em resistência térmica e congelamento. **Revista Ciência Biomédica**, v 2, p. 3139, 1981.
- PAPA, F.O. Contribuição ao estudo da utilização de sêmen congelado de eqüinos: modificações metodológicas para o congelamento e inseminação artificial. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Departamento de Radiologia Veterinária e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista, 1987.150p. Tese (Tese Livre Docência em Reprodução Animal) – FMVZ- **Universidade Estadual Paulista**, 1987.
- PARINAUD, J.; LE LANNOU, D.; VIEITENZ, G. et al. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit©) following ejaculation. **Human Reproduction**, v. 12, n.11, p. 243-2436, 1997.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v.38, p.209-222, 1992.
- PARKS, E. J.; HAMMERSTEDT, H. R. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, p.653- 668, 1985.

- PARKS, J. E.; MEACHAM, T. N.; SAACHE, R. G. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids and viability at 4°C and 37°C. **Biology of Reproduction**, v. 24, n. 2, p. 399-404, 1981.
- PAPA, F.O.; MEIRA, C.; SIMON, J.J.; FERREIRA, J.C.P.;DELL'AQUA JR, J.A.; LEME, D.P. Pregnancies in mare using donkey (*Equus asinus*) frozen semen. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.27, n.1,p.262, 1999.
- PEÑA, A. L.; QUINTELA, L. A.; HERRADÓN, P. G. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. **Theriogenology**, v.50, p.1211-1220, 1998.
- PENA, A.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining e flow cytometry. **Theriogenology**. 52(6):965-80, 1999.
- PERIS, S. I.; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, 2004.
- PIAO, S.; WANG, Y.; CHENG, Y. A study of the technique of freezing concentrated semen of horses (donkeys) and the aspect of insemination. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION**, 11., 1988, Urbana. Proceedings... Dublin: International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination, 1988.
- PICKETT, B. W.; AMANN, R. P. Cryopreservation of semen. In: **McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, Cap. 83, p. 769-789, 1992.
- PINTADO, B.; de la FUENTE, J.; ROLDAN, E. R. S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.145–152, 2000.
- PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**, 48:36-45, 2004a.
- PURDY, P. H.; GRAHAM, J.K. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 522-527, 2004b.
- PUGLIESI, G. Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores. **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa – MG, dissertação de mestrado, 2009.
- QUINN, P. J.; WHITE, I. G. Phospholipid and cholesterol content of epididymal and ejaculated ram spermatozoa and seminal plasma in relation to cold shock. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 1205-1215, 1967.
- PITHA, J.; IRIE, T.; SKLAR, P.B.; NYE, J.S. Drug solubilizers to aid pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. **Life Sci**. 43(6):493- 502, 1988.

- ROTA, A., PENZO, N., VICENTI, L., MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling test (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1415-1420, 2000.
- ROTTEM, S., YASHOUV, J., NE'EMAN, A., RAZIN, A. Composition, ultrastructure and biological properties of membrane from Mycoplasma mycoides var. capri cells adapted to grow with low cholesterol concentrations. **Biochim. Biophys. Acta.** 323:495-508, 1973.
- ROWE, A.W. Biochemical aspects of cryoprotective agents in freezing and thawing. **Cryobiology**, v. 3, p. 12-18, 1966.
- SAENGER, W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. **Angewandte Chemie International ed. in English**, v. 19, n. 5, p. 344-362, 1980.
- SAMPER, J.C. Reproductive system: evaluate of the breeding stallion. In: **FÓRUM INTERNACIONAL DE MEDICINA EQUINA**, 1, São Paulo. Anais... São Paulo: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Equídeos,p.1-18, 2007.
- SENGER, P. L. Principles and procedures for storing and using frozen bovine semen. In: **MORROW, D. A. (Eds.). Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 116-174.
- SERRES, C.; FENEUX, D.; JOUANNET, P.; DAVID, G. Influence of the flagellar wave development and propagation on human sperm movement in seminal plasma. **Gamete Research**, v. 9, p. 183-195, 1984.
- SERRES, C.; RODRIGUEZ, A.; ALVAREZ, A.L.; SANTIAGO, I. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen. **Theriogenology**.v.58,p. 329-332, 2002.
- SILVA, S.S.; HENRY, M.; NUNES, S.A.; MELLO, S.L.V. Influência do sistema de envasamento sobre a qualidade espermática de jumentos (*Equus asinus*) avaliada "in vitro" pós-descongelção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**,v.21,n.3,p.140-146,1997.
- SILVA FILHO, J.M.; VALLE, G.R.; VIANNA, W.S.; PALHARES, M.S. Utilização de manequim para coleta de sêmen eqüino e sua influência sobre características reprodutivas do garanhão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n.5, p.499-504, 1999.
- SINGER, S.; NICHOLSON, G. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science, N.Y.** 175, 720-731, 1972.
- SOUZA, N. L. Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozoides criopreservados eqüinos. 2001. 76p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Universidade de São Paulo**, Pirassununga, 2001.
- SPIZZIRI, B. E., FOX, M. H., BRUEMMER, J. E., SQUIRES, E. L., GRAHAM, J. K. Cholestesrol-loaded-cyclodextrins and fertility pontential of stallions spermatozoa. **An. Reprod. Sci.**,v. 118, p.255-264, 2010.

- SQUIRES E.L., PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M.; BRUMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen, Fort Collins: Animal Reproduction Biotechnology Laboratory, **Colorado State University**, Bulletin (09) 1999.
- SUKARDI, S., CURRY, M.R., WATSON, P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status e viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. **Anim Reprod Sci.** 46(1-2):89-96, 1997.
- THIBAULT, C.; LEVASSEUR, M-C. & HUNTER, R.H.F. **Reproduction in mammals and man.** Paris, Ellipses, 801 p., 1993.
- THOMAS, C. A.; GANER, D. L.; DEJARNETE, J. M.; MARSHALL, C. E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biol Reprod**, v.58, p.786-793, 1998.
- TIBARY, A. Stallion Reproductive Behavior. In: **SAMPER, J.C. et al. (Ed.) Current Therapy in Equine Reproduction.** Saint Louis: Saunders-Elsevier,. p.174 -184, 2007.
- TORRES, P.; SERRES, C.; GÓMEZ-CUÉTARA, C. et al. Effect of cholesterol- loaded cyclodextrin on the motility and plasma membrane integrity of cooled stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1-4, p. 148-151, 2006.
- TROWBRIDGE, I.S. Isolation e chemical characterization of a mitogenic lectin from *Pisum sativum*. **J Biol Chem.** 249(18):6004-12, 1974.
- TRIMECHE, A.; ANTON, M.; RENARD, P.; GANDEMER, G.; TAINTURIER, D. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for freeze preservation of Poitou jackass sperm. **Cryobiology**, v. 34, n.4, p.385 -393, 1997.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; LELANNOU, D.; BARRIÈRE, P.; TAINTURIER, D. Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. **Theriogenology**, v.45, n.5,p.1015-1027, 1996.
- TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v.50, p.793-806, 1998.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA–UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas – SAEG.** Versão 9.1. Viçosa, MG, 2007. 142p.
- VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. **Theriogenology**, v.41, p.483-89, 1994.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002
- VIANA, F. P. Estudo sobre a eficiência dos testes de termorresistência (LENTO e RÁPIDO) em prever a fertilidade do sêmen congelado na espécie bovina. 2004. 67f. Dissertação (Mestrado) – **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista** - UNESP, Botucatu/SP, 2004.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M.; DOLIGEZ, P., BRUNEAU, B.; MAGISTRINI, M.; ECOT, P. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, v. 58, p. 249–251, 2002.

- VIDAMENT, M.; DUPERE, M.; JULIENNE, P.; EVAIN, A.; NOUE, P.; PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v.48, p.907-917, 1997.
- VIDAMENT M.; PIERRICK, V.; MARTIN, F. X. et al. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v.112, p. 22-35, 2009.
- VIERA, R.C.; ARRUDA, R.P.; MANZANO, A. Inseminação intercornual de Inseminação com sêmen congelado em palhetas de 0,5 ml. In: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 22., 1985, Camburiu. Anais... Camburiu: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, p. 298, 1985.
- VISCONTI, P.E., GALANTINO-HOMER, H., NING, X., MOORE, G.D., VALENZUELA, J.P., JORGEZ, C.J. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm: beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. **J. Biol. Chem.** 274:3235-42, 1999.
- ZAHN, F.S., PAPA, F.O., DELLAQUA Jr., J.A., 2002. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. **Theriogenology** 58, 237-240.
- WALTERS, E. M., RIEKE A., GRAHAM, J. K, CRITSER, J. K. Improve osmotic tolerance limits of boar spermatozoa treated with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. **Theriogenology**, v. 70, p. 1394, (abstract) 2008.
- WATSON, P.F. Recent developments e concepts in cryopreservation of spermatozoa e the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.** p. 871-891 1995.
- WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: **Morris, G.J., Clarke, A. (eds): Effects of low temperatures on biological membranes**. London, Academic Press, p.189, 1981.
- WHITE, I. G. Lipids and calcium uptakes of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction Fertility and Development**, 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 sperm prior to and after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 33, n.3, p. 320-329, 1996.
- YANCEY, P.G., RODRIGUEZA, W.V., KILSDONK, E.P., STOUT, G.W., JOHNSON, W.J., PHILLIPS, M.C., ROTHBLAT, G.H. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration Of kinetic pools e mechanism of efflux. **J Biol Chem.** 271(27):16026-34, 1996.
- YEAGLE, P. L. Cholesterol and the cell membranes. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 822, p. 267-287, 1985.

7- ANEXOS

7.1- ANEXO A

STALLION MEDIA – STALP (DILUENTE STALP)

Hepes Buffered Saline (STALP)	1000 mL
NaCl	2,16 g
KCl	0,75 g
KH ₂ PO ₄	0,16 g
NaHCO ₃	3,0 g
MgSO ₄	0,29 g
HEPES	2,4 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,25 g
Fructose	15,2 g
Glucose	1,0 g
Na Pyruvate	0,02 g
Na Lactate	3,7 mL
Bovine Serum Albumin (BSA)	3,0 g

* Osm. (300-310 mOsmol/kg) e pH (7.2-7.4)

DILUIDOR DE MARTIM et al. (1979)

SOLUÇÃO I	
Reagente	Quantidade
D(+) glicose monohidratada	6,0 g
Citrato de sódio	0,375 g
EDTA	0,370 g
Bicarbonato de sódio	0,125 g
Penicilina procaína	50 UI
H2O bidestilada deionizada (q.s.p)	100 mL

SOLUÇÃO II	
Reagente	Quantidade
Solução de lactose a 11%	50 mL
Solução I	25 mL
Gema de ovo de galinha	20 mL
Orvus-Es-Paste	0,08 mL
Glicerol	5 mL
Volume final	100,08 mL

SETUP – HAMILTON THORNE BIOSCIENCES
(Ultimate – Sperm Analyzer)

CARACTERÍSTICA	AJUSTE
Número de imagens adquiridas (<i>Image capture:frames</i>)	30
Taxa de aquisição das imagens (<i>Image capture:frames per sec</i>)	60 Hz
Contraste mínimo da célula (<i>Cell detection:minimum contrast</i>)	80
Tamanho mínimo da célula (<i>Cell detection:minimum size</i>)	3 pixels
Tamanho para células imóveis (<i>Defaults:cell size</i>)	6 pixels
Intensidade para células imóveis (<i>Defaults:cell intensity</i>)	60
Referência de VAP para células progressivas (<i>Progressive cells: VAP</i>)	30,0 µm/s
Referência de VAP para células lentas (<i>Slow cells: VAP cut-off</i>)	20,0 µm/s
Referência de VSL para células lentas (<i>Slow cells: VSL cut-off</i>)	0 µm/s
Limite superior de tamanho da célula (<i>Qc plots: Static size gates-Max</i>)	2,48 pixels
Limite inferior de tamanho da célula (<i>Qc plots: Static size gates-Min</i>)	0,29 pixels
Limite superior de intensidade da célula (<i>Qc plots: Static intensity gates-Max</i>)	1,51
Limite inferior de intensidade da célula (<i>Qc plots: Static intensity gates-Min</i>)	0,46
Limite superior de alongamento da célula (<i>Qc plots: Cell elongation-Max</i>)	98%
Limite inferior de alongamento da célula (<i>Qc plots: Cell elongation-Min</i>)	0%
Aumento (<i>Optics: Magnification</i>)	1,89
Temperatura (<i>Stage:Set stage temperature</i>)	37 °C

**SOLUÇÃO HIPOSMÓTICA
(100 mOsmol/kg)**

Solução I: Sacarose 300 mOsmol/kg	
Reagente	Quantidade
Sacarose	10,269 g
H2O bidestilidade deionizada (q.s.p)	100 mL

Solução II: Sacarose 100 mOsmol/kg	
Reagente	Quantidade
Solução I	100 mL
H2O bidestilidade deionizada (q.s.p)	200 mL
Volume final	300 mL

* Osm. (100 mosmol/kg)

DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

IODETO DE PROPÍDIO (Sigma-Aldrich, 28,707-5 - 25 mg)

Solução estoque

25 mg de PI + 1 mL de DMSO (25 mg/mL)

Solução trabalho (0,5 mg/mL)

20 µL da solução estoque de PI (25 mg/mL) + 980 µL de DPBS

Armazenar em freezer, no escuro.

FITC-PNA (FITC-PNA, Sigma, L-7381 – 2 mg)

Solução Trabalho (100 µg/mL)

2 mg de FITC-PNA + 20 mL de DPBS + 10% de solução de azida de sódio 10%.

7.2- ANEXO B: Análise estatística

Análise do sêmen fresco:

Motilidade

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Jumento	4	90.00000	22.50000	7.500	0.00073
Resíduo	20	60.00000	3.000000		

Coeficiente de Variação= 2.087

NEWMAN KEULS

Variável = MOT (3.000000)

JUMENTO	Descrição	Dados	Médias	Comparações
5%				
3		5	85.0000	A
5		5	85.0000	A
2		5	83.0000	A
1		5	82.0000	AB
4		5	80.0000	B

Vigor

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Jumento	4	0.06000000	0.01500000	0.750	*****
Resíduo	20	0.40000000	0.02000000		

Coeficiente de Variação= 3.571

Concentração

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Jumento	4	96291.04	24072.76	1.164	0.35622
Resíduo	20	413618.2	20680.91		

Coeficiente de Variação= 39.241

Volume

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Jumento	4	6729.986	1682.497	17.830	0.00000
Resíduo	20	1887.272	94.36360		

Coefficiente de Variação= 23.015

N E W M A N K E U L S

Variável = VOL (94.36360)

JUMENTO	Descrição	Dados	Médias	Comparações
5%				
2		5	62.9000	A
3		5	53.3000	AB
1		5	43.0000	BC
4		5	37.4000	C
5		5	14.4400	D

Número total de espermatozoides

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Jumento	4	0.5515309E+09	0.1378827E+09	6.069	0.00229
Resíduo	20	0.4543891E+09	0.2271946E+08		

Coefficiente de Variação= 33.999

N E W M A N K E U L S

Variável = TOTALSPE (0.2271946E+08)

JUMENTO	Descrição	Dados	Médias	Comparações
5%				
2		5	19267.0000	A
4		5	15519.0000	A
1		5	15499.5000	A
3		5	14622.0000	A
5		5	5189.5498	B

Defeitos maiores

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Jumento	4	57.04000	14.26000	4.028	0.01482
Resíduo	20	70.80000	3.540000		

Coefficiente de Variação= 31.782

N E W M A N K E U L S

Variável = TDMAIOR (3.540000)

JUMENTO	Descrição	Dados	Médias	Comparações
5		5	8.0000	A
2		5	6.8000	AB
1		5	6.2000	AB
4		5	5.0000	AB
3		5	3.6000	B

Defeitos menores

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Jumento	4	13.36000	3.340000	1.505	0.23866
Resíduo	20	44.40000	2.220000		

Coefficiente de Variação= 63.134

Defeitos totais

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Jumento	4	61.84000	15.46000	2.781	0.05493
Resíduo	20	111.2000	5.560000		

Coefficiente de Variação= 28.478

Análise do sêmen incubado:**Motilidade**

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	17.00000	5.666667	0,488	*****
Resíduo	96	1114.000	11.60417		

Coefficiente de Variação= 4.328

Vigor

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = VIGOR

Independentes = TRATAMEN

Teste de Kruskal - Wallis

Variável = VIGOR

TRATAMEN	Descrição	Média dos	Média das	
Dados		Dados	Ordens	
0	-----	3.88000	69.0000	25
1	-----	3.82000	63.0000	
25				
2	-----	3.54000	35.0000	
25				
3	-----	3.54000	35.0000	
25				
Valor do Teste = 29.079		(P=0.05) = 7.810	(P=0.01) = 11.340	

Comparações Múltiplas

Classe	Classe	Diferença Observada	Diferença Mínima (P=0.05)	Significativa (P=0.01)
0	1	6.00000	21.07975	25.54752
0	2	34.00000	21.07975	25.54752
0	3	34.00000	21.07975	25.54752
1	2	28.00000	21.07975	25.54752
1	3	28.00000	21.07975	25.54752
2	3	0.00000	21.07975	25.54752

Análise do sêmen pós ressuspensão:

Motilidade

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = MOTILIDA VIGOR

Independentes = TRATAMEN

Teste de Kruskal - Wallis

Variável = MOTILIDA

TRATAMEN Dados	Descrição	Média dos Dados	Média das Ordens
25	0 -----	74.80000	44.9400
25	1 -----	77.00000	53.3200
25	2 -----	77.20000	53.6000
25	3 -----	76.60000	50.1400
Valor do Teste = 1.444 (P=0.05) = 7.810 (P=0.01) = 11.340			

C o m p a r a ç õ e s M ú l t i p l a s

Classe	Classe	Diferença Observada	Diferença Mínima (P=0.05)	Significativa (P=0.01)
0	1	8.38000	21.07975	25.54752
0	2	8.66000	21.07975	25.54752
0	3	5.20000	21.07975	25.54752
1	2	0.28000	21.07975	25.54752
1	3	3.18000	21.07975	25.54752
2	3	3.46000	21.07975	25.54752

Vigor

Variável = VIGOR

TRATAMEN Dados	Descrição	Média dos Dados	Média das Ordens
25	0 -----	3.50000	46.5000
25	1 -----	3.60000	56.2600
25	2 -----	3.58000	54.3400
25	3 -----	3.48000	44.9000
Valor do Teste = 2.830 (P=0.05) = 7.810 (P=0.01) = 11.340			

C o m p a r a ç õ e s M ú l t i p l a s

Classe	Classe	Diferença Observada	Diferença Mínima (P=0.05)	Significativa (P=0.01)
0	1	9.76000	21.07975	25.54752
0	2	7.84000	21.07975	25.54752
0	3	1.60000	21.07975	25.54752
1	2	1.92000	21.07975	25.54752
1	3	11.36000	21.07975	25.54752
2	3	9.44000	21.07975	25.54752

Análise do sêmen resfriado:

Motilidade

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = MOTILIDA

Independentes = TRATAMEN

T e s t e d e K r u s k a l - W a l l i s

Variável = MOTILIDA

TRATAMEN	Descrição	Média dos Dados	Média das Ordens
0	-----	69.88000	46.9600
25			
1	-----	74.00000	51.4000
25			
2	-----	75.80000	62.2000
25			
3	-----	72.20000	41.4400
25			
Valor do Teste = 6.900		(P=0.05) = 7.810	(P=0.01) = 11.340

C o m p a r a ç õ e s M ú l t i p l a s

Classe	Classe	Diferença Observada	Diferença Mínima (P=0.05)	Significativa (P=0.01)
0	1	4.44000	21.07975	25.54752
0	2	15.24000	21.07975	25.54752
0	3	5.52000	21.07975	25.54752
1	2	10.80000	21.07975	25.54752
1	3	9.96000	21.07975	25.54752
2	3	20.76000	21.07975	25.54752

Vigor

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	0.490000	0.1633333	2.119	0.10287
Resíduo	96	7.400000	0.0770833		

Coefficiente de Variação= 8.388

Análise do sêmen congelado:

Motilidade subjetivo

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-parametrica

Dependentes = MOTMARTI

Independentes = TRAT

T e s t e d e K r u s k a l - W a l l i s

Variável = MOTMARTI

TRAT	Descrição	Média dos Dados	Média das Ordens
0	-----	65.00000	43.4800
25			
1	-----	72.40000	53.2400
25			
2	-----	72.20000	51.0600
25			
3	-----	70.00000	54.2200
25			
Valor do Teste =		2.107	(P=0.05) = 7.810
11.340			(P=0.01) =

C o m p a r a ç õ e s M ú l t i p l a s

Classe	Classe	Diferença Observada	Diferença Mínima (P=0.05)	Significativa (P=0.01)
0	1	9.76000	21.07975	25.54752
0	2	7.58000	21.07975	25.54752
0	3	10.74000	21.07975	25.54752
1	2	2.18000	21.07975	25.54752
1	3	0.98000	21.07975	25.54752
2	3	3.16000	21.07975	25.54752

Vigor

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	0.1031463E-01	0.3438209E-02	0.068	*****
Resíduo	94	4.734583	0.5036791E-01		

Coefficiente de Variação= 7.610

Motilidade total - CASA

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	4477.840	1492.613	5.715	0.00122
Resíduo	96	25072.00	261.1667		

Coefficiente de Variação= 21.536

NEWMAN KEULS

Variável = MOTILE_P (261.1667)

TRAT	Descrição	Dados	Médias	Comparações
3		25	81.1200	A
2		25	80.0000	A
1		25	74.8400	A
0		25	64.2000	B

Motilidade progressiva - CASA

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	2868.510	956.1700	4.329	0.00660
Resíduo	96	220.8633	220.8633		

Coefficiente de Variação= 33.166

NEWMAN KEULS

Variável = PROGRESS (220.8633)

TRAT	Descrição	Dados	Médias	Comparações
3		25	49.1600	A
2		25	47.9200	A
1		25	46.4800	A
0		25	35.6800	B

VAP

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	481.6499	160.5500	1.533	0.21087
Resíduo	96	10052.64	104.7150		

Coefficiente de Variação= 11.784

VCL

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	1074.815	358.2716	1.681	0.17631
Resíduo	96	20465.83	213.1857		

Coefficiente de Variação= 11.178

VSL

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	383.6675	127.8892	1.304	0.27764
Resíduo	96	9414.942	98.07232		

Coefficiente de Variação= 12.672

ALH

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	0.5115000	0.1705000	0.705	*****
Resíduo	96	23.20960	0.2417667		

Coefficiente de Variação= 10.500

LIN

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	95.40000	31.80000	1.710	0.17016
Resíduo	96	1785.600	18.60000		

Coefficiente de Variação= 7.248

STR

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	58.40000	19.46667	2.203	0.09268
Resíduo	96	848.2400	8.835833		

Coefficiente de Variação= 3.439

BCF

Variável = BCF

TRAT Dados	Descrição	Média dos Dados	Média das Ordens
0	-----	40.19000	28.6000
10			
1	-----	39.41000	22.4500
10			
2	-----	37.89000	17.8000
10			
3	-----	33.78000	13.1500
10			
Valor do Teste = 9.565		(P=0.05) = 7.810	(P=0.01) = 11.340

C o m p a r a ç õ e s M ú l t i p l a s

Classe	Classe	Diferença Observada	Diferença Mínima (P=0.05)	Significativa (P=0.01)
0	1	6.15000	13.43064	16.27721
0	2	10.80000	13.43064	16.27721
0	3	15.45000	13.43064	16.27721
1	2	4.65000	13.43064	16.27721
1	3	9.30000	13.43064	16.27721
2	3	4.65000	13.43064	16.27721

Motilidade TTR0

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	549.3535	183.1178	1.742	0.16364
Resíduo	95	9986.000	105.1158		

Coefficiente de Variação= 18.919

Vigor TTR0

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	0.1122475E-01	0.3741582E-02	0.075	*****
Resíduo	95	4.736250	0.4985526E-01		

Coefficiente de Variação= 7.570

Motilidade TTR30

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	922.3346	307.4449	2.650	0.05327
Resíduo	95	11023.63	116.0382		

Coefficiente de Variação= 21.632

Vigor TTR30

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	0.3595076	0.1198359	1.332	0.26874
Resíduo	95	8.549583	0.8999561E-01		

Coefficiente de Variação= 10.702

Motilidade TTR60

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	519.0013	173.0004	1.224	0.30532
Resíduo	95	13426.96	141.3364		

Coefficiente de Variação= 26.301

Vigor TTR60

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	0.7569823	0.2523274	2.305	0.08175
Resíduo	95	10.39958	0.1094693		

Coefficiente de Variação= 12.360

Motilidade TTR90

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	1170.422	390.1406	2.017	0.11682
Resíduo	95	18379.76	193.4712		

Coefficiente de Variação= 36.200

Vigor TTR90

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	0.3295076	0.1098359	0.692	*****
Resíduo	95	15.07958	0.1587325		

Coefficiente de Variação= 16.132

Motilidade TTR120

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	1304.122	434.7075	1.898	0.13511
Resíduo	95	21753.96	228.9890		

Coefficiente de Variação= 46.096

Vigor TTR120

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	0.5792045	0.1930682	0.875	*****
Resíduo	95	20.96625	0.2206974		

Coefficiente de Variação= 21.237

Reativo (HOST)

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	3933.347	1311.116	8.242	0.00007
Resíduo	94	14952.65	159.0708		

Coefficiente de Variação= 44.143

N E W M A N K E U L S

Variável = HOSTF (159.0708)

TRAT	Descrição	Dados	Médias	Comparações
5%				
1		25	32.6400	A
3		24	32.4167	A
2		24	31.7500	A
0		25	17.7600	B

Não corado (SV)

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	7565.870	2521.957	14.002	0.00000
Resíduo	96	17290.64	180.1108		

Coefficiente de Variação= 28.512

N E W M A N K E U L S

Variável = SV (180.1108)

TRAT 5%	Descrição	Dados	Médias	Comparações
2		25	55.6000	A
3		25	50.2400	A
1		25	49.9200	A
0		25	32.5200	B

Defeitos maiores

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	46.93935	15.64645	2.098	0.10575
Resíduo	94	701.1117	7.458635		

Coefficiente de Variação= 46.873

Defeitos menores

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	68.55364	22.85121	5.694	0.00126
Resíduo	94	377.2117	4.012890		

Coefficiente de Variação= 64.366

N E W M A N K E U L S

Variável = TDMENOR (4.012890)

TRAT 5%	Descrição	Dados	Médias	Comparações
1		25	4.4400	A
3		24	3.1667	B
2		24	2.4583	B
0		25	2.3600	B

Defeitos totais

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	106.3927	35.46422	4.289	0.00698
Resíduo	94	777.2400	8.268511		

Coefficiente de Variação= 32.169

N E W M A N K E U L S

Variável = DTOTAIS (8.268511)

TRAT	Descrição	Dados	Médias	Comparações
5%				
1		25	10.4800	A
0		25	9.2000	AB
3		24	8.2500	B
2		24	7.7500	B

Membrana lesada, acrossoma intacto (MLAI)

Fontes de Variação	G. L.	Soma de Quadrado	Quadrado Médio	F	Signif.
Tratamento	3	3104.162	1034.721	5.153	0.00241
Resíduo	96	19278.02	200.8127		

Coefficiente de Variação= 22.955

N E W M A N K E U L S

Variável = MLAI (200.8127)

TRATAMEN	Descrição	Dados	Médias	Comparações
5%				
0		25	70.1600	A
2		25	62.5920	AB
1		25	59.2400	B
3		25	54.9360	B

Procedimento = Análise Não-paramétrica

Objetivo = Análise de variância não-paramétrica

Dependentes = MIAI MIAL MLAL

Independentes = TRATAMEN

MIAI (membrana intacta, acrossoma intacto)

Teste de Kruskal - Wallis

Variável = MIAI

TRATAMEN Dados	Descrição	Média dos Dados	Média das Ordens
10	0 -----	18.66000	13.5000
10	1 -----	32.68000	23.0000
10	2 -----	32.33000	21.5000
10	3 -----	35.22000	24.0000

Valor do Teste = 5.012 (P=0.05) = 7.810 (P=0.01) = 11.340

MIAL (membrana intacta, acrossoma lesado)

Comparações Múltiplas

Classe	Classe	Diferença Observada	Diferença Mínima (P=0.05)	Significativa (P=0.01)
0	1	9.50000	13.43064	16.27721
0	2	8.00000	13.43064	16.27721
0	3	10.50000	13.43064	16.27721
1	2	1.50000	13.43064	16.27721
1	3	1.00000	13.43064	16.27721
2	3	2.50000	13.43064	16.27721

Variável =

TRATAMEN Dados	Descrição	Média dos Dados	Média das Ordens
10	0 -----	0.10000	18.8500
10	1 -----	0.70000	19.2000
10	2 -----	0.00000	17.0000
10	3 -----	7.68000	26.9500

Valor do Teste = 4.263 (P=0.05) = 7.810 (P=0.01) = 11.340

C o m p a r a ç õ e s M ú l t i p l a s

Classe	Classe	Diferença Observada	Diferença Mínima (P=0.05)	Significativa (P=0.01)
0	1	0.35000	13.43064	16.27721
0	2	1.85000	13.43064	16.27721
0	3	8.10000	13.43064	16.27721
1	2	2.20000	13.43064	16.27721
1	3	7.75000	13.43064	16.27721
2	3	9.95000	13.43064	16.27721

MLAL (Membrana lesada, acrossoma lesado)

Variável = MLAL (Membrana lesada, acrossoma lesado)

TRATAMEN Dados	Descrição	Média dos Dados	Média das Ordens
0	-----	11.03000	24.2000
10			
1	-----	5.62000	19.0500
10			
2	-----	5.49000	18.5000
10			
3	-----	6.82000	20.2500
10			
Valor do Teste = 1.453		(P=0.05) = 7.810	(P=0.01) = 11.340

C o m p a r a ç õ e s M ú l t i p l a s

Classe	Classe	Diferença Observada	Diferença Mínima (P=0.05)	Significativa (P=0.01)
0	1	5.15000	13.43064	16.27721
0	2	5.70000	13.43064	16.27721
0	3	3.95000	13.43064	16.27721
1	2	0.55000	13.43064	16.27721
1	3	1.20000	13.43064	16.27721
2	3	1.75000	13.43064	16.27721