



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**MARIA ALICE MARANHÃO SANTOS**

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN À FRESCO E  
CONGELADO-DESCONGELADO DE GARANHÕES DA RAÇA  
NORDESTINA**

Petrolina – PE  
2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**MARIA ALICE MARANHÃO SANTOS**

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN À FRESCO E  
CONGELADO-DESCONGELADO DE GARANHÕES DA RAÇA  
NORDESTINA**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenice Andrade Moraes  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Gradela

Petrolina – PE  
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Maria Alice Maranhão Santos

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN À FRESCO E  
CONGELADO-DESCONGELADO DE GARANHÕES DA RAÇA  
NORDESTINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, *Campus Ciências Agrárias*, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

---

Profa. Dra. Elenice Andrade Moraes  
UNIVASF / Presidente da banca (Orientador)

---

Profa. Dra. Adriana Gradela  
UNIVASF/ Co-orientadora

---

Prof. Dr Edilson Soares Lopes Júnior  
UNIVASF

Petrolina – PE, 01 de Novembro de 2014

**“Sorri, sorri sempre,  
Ainda que o teu sorriso seja triste,  
Porque mais triste que o teu sorriso triste,  
É a tristeza de não saber sorrir.”**

**Dedico aos meus pais, pelo incentivo constante e exemplo de dedicação,  
humildade e caráter. Pela torcida e orgulho ao ver-me concluir esta  
importante etapa na minha vida.**

**Amo vocês!**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela minha vida, por me conceder saúde, paz e sabedoria, além de guiar sempre o meu caminho.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) e ao Curso de Pós Graduação em Ciência Animal pela oportunidade.

À FACEPE, Fundação de Amparo à Ciência de Tecnologia do Estado de Pernambuco, pela concessão da bolsa.

A minha orientadora Professora Elenice Andrade Moraes, que com o seu saber, a sua colaboração, dedicação, sugestões e o seu apoio crítico contribuiu de forma grandiosa para realização desse estudo.

Agradeço igualmente à Professora Adriana Gradela, minha co-orientadora. Obrigada pela dedicação, contribuição, incentivo e confiança na realização deste trabalho.

A todos os professores do curso que brilhantemente transmitiram seus conhecimentos durante as aulas, com muita dedicação e carinho. Obrigada pelos ensinamentos e a amizade.

Aos proprietários do haras, Carlos Augusto (Macaxeira) e Luiz Cleber, por disponibilizar a estrutura e os animais para a realização deste estudo. Ao senhor Ademir pela ajuda durante as coletas de sêmen.

À empresa Botupharma pela cessão dos diluentes e materiais utilizados nos experimentos.

À meus pais. Obrigada pelo amor incondicional, apoio, incentivo constante e exemplo de dedicação, caráter e humildade. Amo vocês!!!

À minha querida avó Juliêta por está sempre presente em minhas conquistas, sendo o sustentáculo da minha vida.

Aos meus irmãos Rafael e Sanderson. Obrigada pelos conselhos, compreensão, dedicação e auxílio durante a execução das atividades.

Aos meus amados sobrinhos Alanys, Antônio, Arthur e João Miguel, por fazer os meus dias mais felizes e completos. Amo muito vocês.

Ao meu noivo Marcello, pela compreensão e, especialmente, pelo amor, carinho e atenção dedicada ao longo desta caminhada. TE AMO!

Não poderia deixar de agradecer a minha queridíssima dupla dinâmica, pelo apoio e contribuição extraordinária. Além disso, tornaram os dias de

trabalho mais leves e divertidos, com momentos inesquecíveis, muitas gargalhadas e companheirismo. Vocês conquistaram um espaço no meu coração e sempre me lembrarei de vocês com muito carinho: Lucas e Saulo.

Agradeço também aos demais colegas do CPSENS, Gabriel, Jonathan, Laícia, Laiane, Ricardo e Wasley que também fazem parte desta história e com quem pude dividir boas conversas e risadas.

Aos colegas de pós-graduação, Fernanda, Jennifer, Heidy, Isabela, Ivonete, Máira e Tiara. E a minha mais nova amiga Márcia. Obrigada pela sua contribuição, dedicação e paciência, seu apoio foi muito importante. É como eu sempre digo: “quem tem amigos, tem tudo”.

Todas essas pessoas foram muito importantes para mim, e todas elas essenciais na realização deste trabalho.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar as características seminais, da membrana plasmática e do acrossoma de espermatozoide congelado/descongelado de garanhões da raça Nordestina. Foram utilizados dois animais, clinicamente saudáveis, com idade média de 9,5 anos, durante a estação reprodutiva de 2013/2014. Ejaculados (N= 19) foram coletados por meio da vagina artificial e égua em estro na fazenda da ABCCN, Juazeiro – BA. O sêmen foi avaliado fisicamente (cor, odor, volume e aspecto); diluído (1:1) com Botu-sêmen® e transportado ao CPSENS. Após, foi centrifugado e a concentração determinada em Fotômetro. Em seguida foi rediluído (Botu-crio®) até a concentração de  $10^6$  espermatozoides/ml e as motilidades total (MT) e progressiva (MP) avaliadas pelo CASA. Ejaculados  $\geq 70,0\%$  de MT foram congelados. O sêmen diluído foi submetido ao teste de termo resistência lento (TTR) e descongelado aos testes TTR, hiposmótico (HOST), supravital, teste com sondas fluorescentes e de ligação à membrana perivitelina (MPV) da gema do ovo de galinha e à avaliação da morfologia. As variáveis foram avaliadas pela ANOVA e pelo teste de SNK ( $P < 0,05$ ). A MT e a MP foram maiores ( $P < 0,05$ ) no sêmen diluído do que no descongelado e ambas foram superiores no tempo 0 em relação a 150 min. Os valores percentuais da integridade funcional espermática do sêmen imediatamente pós-descongelamento (0 mOsm) e após o HOST (125 mOsm) foram, respectivamente,  $40,61 \pm 7,97\%$  e  $54,82 \pm 9,09\%$ , tendo havido  $14,21 \pm 1,12\%$  de reativos. A porcentagem de células espermáticas viáveis pelo teste supravital foi de  $62,22 \pm 9,06\%$  e pela sonda SYBR-14 de  $76,97 \pm 29,74\%$  e o número médio de espermatozoides ligados à MPV de  $230,39 \pm 57,09$ . As características físico-morfológicas espermáticas observadas para a raça Nordestina mantiveram-se dentro dos valores considerados normais para espécie equina. Estas juntamente com os resultados do teste de ligação serão um referencial para a raça em estudos futuros uma vez que, inexistem dados comparativos para esta raça.

**Palavras-chave:** CASA, Motilidade Espermática, Teste Supravital, Teste de Ligação, TTR.

## ABSTRACT

Objective was to evaluate the seminal characteristics of the plasma membrane and acrosome of sperm frozen / thawed horse breed of the Northeast. Two animals were used, clinically healthy, with an average age of 9.5 years, during the breeding season of 2013/2014. Nineteen ejaculates (N=19) were collected by artificial vagina and mare in estrus at farm ABCCN, Juazeiro - BA. Semen was physically assessed (color, odor, volume and appearance); diluted (1: 1) with Botu-sêmen® and transported to CPSENS. After, it was centrifuged and the concentration determined in Photometer. Then it was rediluted (Botu-crio®) up to a concentration of  $10^6$  sperm / ml and the total motility (TM) and progressive (MP) evaluated by CASA. Ejaculated  $\geq 70.0\%$  of MT were frozen. The diluted semen was submitted to slow term resistance test (TTR) and thawed to TTR tests, hyposmotic (HOST), supravital, test with fluorescent probes and connection perivitelline membrane (MPV) of chicken egg yolk and the assessment of morphology. The variables were evaluated by ANOVA and the SNK test ( $P < 0.05$ ). The MT and MP were higher ( $P < 0.05$ ) on diluted semen than on thawed and both were superior regarding at time 0 to 150 minutes. The percentages of sperm functional integrity of the semen immediately after thawing (0 mOsm) and after the HOST (125 mOsm) were respectively  $40.6 \pm 7.97\%$  and  $54.82 \pm 9.09\%$ , having been  $14.21 \pm 1.12\%$  of reactive. The percentage of viable sperm cells on the supravital test was  $62.22 \pm 9.06\%$  and the SYBR-14 probe was  $76.97 \pm 29.74\%$  and the average number of spermatozoa bound to the MPV was  $230.39 \pm 57.09$ . Sperm physical and morphological characteristics observed for the Northeastern breed remained within normal values for equine species. These results together with the connection test will be a reference for the race in future studies since there are no comparative figures for this breed.

Keywords: CASA, Sperm Motility, Supravital Test, Connection Test, TTR.





## LISTA DE TABELAS

### Páginas

<b>Tabela 1</b> – Médias de motilidade espermática total e progressiva de ganhões da raça Nordestina após o teste de termo resistência (TTR). Petrolina, al. (2013/2014).....	34
<b>Tabela 2</b> – Percentual médio de anormalidades espermáticas observadas no sêmen descongelado de ganhões da raça Nordestina. Petrolina, 2013/2014.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCCN	Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Nordestino
ANOVA	Analysis of Variance (Análise de variância)
ATP	Adenosine triphosphate (Trifosfato de Adenosina)
CASA	Computer Assisted <i>Semen</i> Analysis (Análise computadorizada do sêmen)
CEDEP	Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CNA	Estudo do complexo agronegócio do Cavalo
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxirribonucleico)
HOST	Hypoosmotic swelling test (Teste Hiposmótico)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L	Litro (s)
m	Metro (s)
Min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
MPV	Membrana Perivitelina
MP	Motilidade Progressiva
MT	Motilidade Total
P	Nível de Significância
PI	Propidium iodide (Iodeto de propídio)
Rpm	Rotações por Minuto
SNK	Student Newman- Keuls
SYBR-14	Select Master Mix
SAEG	Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas
STALP	Hepes Buffered Saline (Solução salina tamponada com hepes)
TALP	Tyrode Medium Whit Albumin Lactate and Pyruvate (Meio Tyrode com albumina, lactato e piruvato)
TTR	Teste de Termo Resistência
µL	Microlitro (s)
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
X	Vezez
10 <sup>6</sup>	Milhões
<	Menor que
>	Maior que
±	Mais ou menos
®	Marca registrada
mOsm	Miliosmol

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1. A raça Nordestina .....	15
2.2. O sêmen equino .....	16
2.2.1. Plasma seminal .....	16
2.2.2. O espermatozoide .....	17
2.2.2.1. Membrana plasmática .....	19
2.3. Avaliação espermática. ....	19
2.3.1. Motilidade espermática. ....	19
2.3.2. Teste de Termo Resistência Lento (TTR).....	
20	
2.3.3. Teste hiposmótico (Host) .....	20
2.3.3. Teste supravital .....	21
2.3.5. Teste com sonda fluorescente.....	22
2.3.6. Ligação de oócitos à membrana perivitelina (MPV) da gema de ovo de galinha.....	22
2.3.7. Morfologia espermática .....	23
2.4. Criopreservação .....	23
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	25
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	26
4.1 Geral.....	26
4.2 Específicos.....	26
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	39
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	40
<b>9. ANEXOS</b> .....	51

# 1. INTRODUÇÃO

O rebanho equídeo brasileiro é de 7.793 milhões de animais (IBGE, 2010), destes, 7,5 milhões são equinos (CNA, 2006). Como parte deste efetivo, encontra-se o cavalo Nordestino, considerado uma das maiores riquezas do Nordeste brasileiro, tendo como principal habitat a região do semiárido (MELO, 2011). A maior concentração dos rebanhos encontra-se nos estados da Bahia, Pernambuco, Ceará e Piauí (BECK, 1985).

A raça Nordestina se caracteriza, pela rusticidade, sobriedade, rigidez muscular, temperamento sociável e amistososo, fácil adaptação ao meio e ao processo de criação (ARAÚJO, 1983). É uma raça adaptada pela aridez e deficiências da região Nordeste do Brasil, utilizada, principalmente, no trabalho com o gado, vivendo de modo rústico, com pouco alimento e pouca água. Apesar destas condições e de sua pequena estatura, magreza e aparência resignada, trabalha bem viajando grandes distâncias. É, portanto, essencial em seu ambiente natural, a caatinga agressiva, onde presta relevantes serviços à economia da região, não só transportando cargas, como também pessoas (ENCICLOPÉDIA, 2014).

Entretanto, com o fechamento da Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Nordestino, no início da década de 90, muitos desses animais passaram a se reproduzir ao acaso. As fêmeas têm sido acasaladas com reprodutores Mangalarga Marchador e Quarto-de-Milha para produção de mestiços para vaquejadas (COSTA; FERREIRA, 2001) e os melhores machos castrados e utilizados na lida do gado. Sendo assim, é imprescindível a realização de programas que promovam a seleção, preservação e reprodução desse genoma, principalmente, em virtude do risco de extinção da raça e das transformações climáticas do planeta.

A criopreservação de sêmen representa uma importante ferramenta na preservação da raça equina, tanto pela maximização do uso de reprodutores superiores quanto pela formação de um banco genético disponível por tempo indeterminado (SAMPER; HANKINS, 2001). Entretanto, variações quanto a certos aspectos do sêmen congelado/descongelado, descritas em várias raças equinas (ALVARENGA et al., 2003), são um entrave à disseminação

da técnica e têm, inclusive, levado à classificação dos ganhões como “resfriadores bons” ou “resfriadores ruins”, segundo a susceptibilidade do ejaculado à criopreservação (BRINSKO et al., 2000; BATELLIER et al., 2001; CARMO; ALMEIDA, 2006).

A membrana plasmática apresenta organização estrutural de bicamada de lipídeos, contendo moléculas de fosfolipídios polares, distribuídas assimetricamente, de propriedades anfipáticas, onde a porção hidrofóbica direciona-se para o centro da membrana e a porção hidrofílica, para a superfície da membrana. Dentre os principais fosfolipídios presentes nesta estrutura têm-se a colina, serina, glicerol e inositol, glicolipídios e colesterol (FLESCH; GADELLA, 2000). Além disso, a membrana plasmática desempenha importante papel na capacidade fecundante do espermatozoide, modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, por fim, na capacitação e penetração do oócito (LENZI et al., 1996).

A despeito dos conhecimentos já alcançados, ainda não há padronização de um protocolo para congelação de sêmen equino, sendo comum a adoção de protocolos individualizados para cada ganhão (LOOMIS; GRAHAM, 2008). Portanto, para que possa apresentar melhores resultados na espécie equina, são necessários mais estudos sobre os vários aspectos relacionados à fisiologia da célula espermática quando submetida à refrigeração, congelação e descongelação (ARRUDA et al., 2007).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. A raça Nordestina**

A equideocultura é responsável pela geração de 642,5 mil empregos diretos e 2,6 milhões de empregos indiretos, sendo o faturamento anual da indústria do cavalo em torno de 7,5 bilhões de reais (CNA, 2010) e o faturamento em leilões de 2.058.202.871. Por sua vez, a indústria de medicamentos movimentou aproximadamente, R\$ 54.142.630,20 e o mercado das rações para equinos, R\$ 53.440.000,00 (LIMA; SHIROTA; BARROS, 2006). Como parte deste efetivo, encontra-se o cavalo Nordestino, o qual é uma das maiores riquezas do Nordeste brasileiro que habita desde os estados do Maranhão, Piauí e Ceará até o sertão da Bahia (AGROCAVE, 2014).

O cavalo nordestino é um descendente do cavalo Barbo-árabe, originário de Portugal e Espanha, introduzido no Brasil no período colonial, sendo seu tipo morfológico bastante semelhante ao do cavalo Barbo (COSTA; LOPES DO VALE; LEITE, 1974). A altura mínima para o padrão da raça, estabelecida pela ABCCN (1987), é de cerca de 1,30 m para machos, sendo a ideal de 1,38 m e a máxima de 1,46 m; e para as fêmeas, a mínima é de 1,27 m, a ideal de 1,35 m e a máxima de 1,43 m. O peso é de, aproximadamente 350 kg e a pelagem predominante a castanha (COSTA; LOPES DO VALE; LEITE, 1974).

Segundo Costa e Ferreira (2001), o cavalo Nordestino é de pequeno porte, cabeça pequena, fronte larga, ganachas afastadas, olhos grandes e vivos, orelhas pequenas, afastadas e móveis, narinas dilatadas e perfil retilíneo para subconvexo. Pescoço musculoso e bem implantado, corpo bem proporcionado, com cernelha pouco saliente, linha dorso lombar ligeiramente enclavada, lombo largo, garupa levemente inclinada, cauda bem inserida, mas não muito espessa. Os membros são descarnados, porém com ossatura forte, com aprumos regulares, tendões salientes, boletos com pêlos finos e curtos, cascos pequenos, escuros e muito resistentes, o que dispensam o uso de ferraduras (Figura 1).





**Figura 1** – Garanhão da raça Nordestina. (Fonte: SANTOS, 2013).

As pelagens predominantes são a tordilha e a castanha (TORRES; JARDIM, 1992) e sua principal aptidão é direcionada para a lida com o gado, característica muito importante, já que poucas raças se adaptam às difíceis condições da caatinga nordestina. Vale ressaltar que, sem o cavalo Nordestino, o vaqueiro não poderia trabalhar com tanta eficiência, pois várias raças equinas não possuem os cascos fortes para suportar o trabalho nesta região (MELO, 2011).

## **2.2. O sêmen equino**

### **2.2.1 Plasma seminal**

Wite (1988) relatou que o sêmen é caracterizado pela presença de duas porções distintas: os espermatozoides, que compõem menos de 1% do volume total; e o plasma seminal, definido como um conjunto de secreções próprias do aparelho genital masculino (MIES FILHO, 1987). Os primeiros estudos sobre o sêmen equino foi realizado por Von Leuwenhoeck em 1678 *apud* Sobreira Neto (2008), o qual classificou os espermatozoides como “parasitas” do plasma

seminal. Já Prevost e Dumas (1830) *apud* Sobreira Neto (2008) demonstraram que os espermatozoides eram essenciais para a fertilidade enquanto Kareskoski e Katila (2008) afirmaram que o plasma seminal é constituído pelo fluido produzido na rede testis, epidídimo e glândulas acessórias, o qual é expelido durante a ejaculação, em frações, por meio de contrações uretrais.

O plasma seminal exerce várias funções sobre o metabolismo espermático e no processo de fecundação, merecendo destaque a ação antimicrobiana, ativação na motilidade espermática, neutralização dos metabólitos espermáticos, proteção contra a acrosina por meio de inibidores de proteases, dentre outras. Além disso, possui função de mediador da capacitação espermática e da resposta pós-coital. Entretanto, alguns estudos com o sêmen equino demonstram que a presença do plasma seminal em grande quantidade possui efeito deletério aos espermatozoides como a diminuição da motilidade espermática (LOVE et al., 2002; AURICH, 2008).

Algumas técnicas de criopreservação do sêmen equino recomendam a remoção do plasma seminal uma vez que a sua presença promove efeito nocivo sobre a preservação das células espermáticas (KARESKOSKI; KATILA, 2008). Neste contexto, a centrifugação é realizada com o objetivo de promover a redução do percentual do plasma seminal e aumentar a concentração espermática durante a criopreservação do sêmen equino (LOVE et al., 2002; AURICH, 2008).

### **2.2.2. O espermatozoide**

Os espermatozoides são células alongadas, constituídas de três segmentos: a cabeça, a peça intermediária e a cauda (Figura 2) (HAFEZ; HAFEZ, 2004). De acordo com Amann e Graham (1993) *apud* Guasti; Monteiro; Papa (2012), o espermatozoide é revestido por uma membrana plasmática lipoproteica, a qual é composta por dupla camada de lipídios, proteínas e carboidratos.

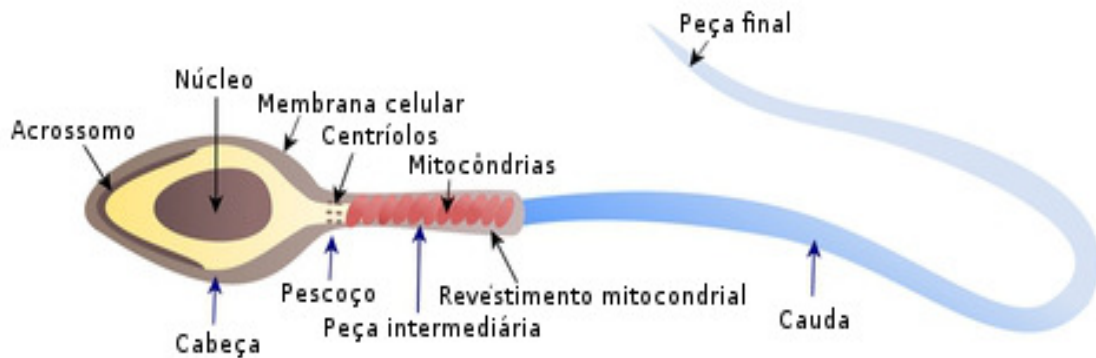
Os fosfolipídios são constituídos por uma alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, garantindo fluidez à membrana. Os principais lipídios encontrados na membrana plasmática são glicolipídios e, dentre os esteróis, o colesterol é o mais importante. Oliveira (2007<sup>a</sup>) descreveu que as proteínas integrais ou periféricas agem com receptores associados à interação com o

oócito, como bombas de sódio, cálcio e outros íons. Já Silva et al. (2013) relataram que os carboidratos são encontrados na superfície da membrana plasmática e são responsáveis pela união entre as células, como, por exemplo, a ligação entre o espermatozoide e o oócito.

A cabeça apresenta forma oval e achatada, contendo cromatina altamente compacta ou condensada que compreende um complexo DNA, como também apresenta uma classe especial de proteínas denominadas protaminas espermáticas. Já o acrossoma é definido como uma estrutura de dupla parede, situada entre a membrana plasmática e a porção anterior do núcleo, proveniente do complexo de golgi originado durante a espermatogênese. Este possui enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de fecundação, oferecendo, desta forma, proteção ao DNA contra choques mecânicos. O colo conecta a cabeça do espermatozoide à cauda (flagelo), que é subdividida em peça intermediária, principal e terminal (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Segundo Oliveira (2007<sup>a</sup>), a peça intermediária contém mitocôndrias que convertem glicose em ATP e enviam energia para as demais organelas, sendo denominada de “casa de força”. Além disso, possui feixes de fibras que se alongam pela cauda do espermatozoide e são responsáveis pelo seu movimento. Com relação à peça principal, Vidigal (2008) relatou que as fibras iniciadas na peça intermediária continuam-se pela peça principal, sendo envolvidas por uma bainha proteica e a movimentação ocorre pelo deslizamento dessas fibras para frente e para trás, umas sobre as outras, provocando, dessa maneira, um movimento sincronizado da célula espermática. Já as fibras da cauda, iniciadas na peça intermediária, terminam na peça final, última porção do espermatozoide e é neste local em que a membrana plasmática se insere de forma crônica (SQUIRES et al., 1999).

**Figura 2-** Anatomia de um espermatozoide. (Fonte: Zuzanae/Shutterstock.com)



### 2.2.2.1. Membrana plasmática

A membrana plasmática e o acrossoma do espermatozoide estão intimamente envolvidos no processo de fecundação do oócito (PICKETT et al., 1989 *apud* ANTUNEZ et al., 2010), de modo que, qualquer alteração em suas estruturas são relevantes para o poder fecundante dos espermatozoides e, conseqüentemente, para a fertilidade do garanhão. Alterações, desestabilização das membranas devido à reorganização e perda de lipídios, conjuntamente com peroxidação lipídica, em decorrência da ação de espécies reativas de oxigênio, são observadas durante os processos de congelação e descongelação e podem comprometer a habilidade dos espermatozoides em alcançarem, se ligarem e reagirem com a zona pelúcida, pois afeta a motilidade, a resposta ao estresse osmótico e os mecanismos de sinalização dos espermatozoides (RICKER; LINFOR; DELFINO 2006). Portanto, para que o espermatozoide possua viabilidade e capacidade fecundante, a membrana plasmática deve apresentar integridade física e funcional (OLIVEIRA, 2007<sup>b</sup>).

## 2.3. Avaliação espermática

### 2.3.1. Motilidade espermática

A avaliação da motilidade espermática consiste na determinação do percentual dos espermatozoides móveis no ejaculado (PICKETT, 1993 *apud*

ALMEIDA, 2006). Constitui-se num recurso muito utilizado para avaliar os efeitos da criopreservação sob os espermatozoides, sendo utilizada em diversos estudos com o intuito de se obter comparações entre os diluentes, os métodos de resfriamento e congelação, bem como entre as diluições utilizadas (KENNEY et al., 1983 *apud* TERRACIANO, 2008; VARNER et al., 1988 *apud* OLIVEIRA 2007; PICKETT, 1993 *apud* ALMEIDA, 2006).

Neste contexto, a motilidade é considerada um elemento indispensável para a fecundação, onde um dano irreversível representa uma perda da função celular (OLIVEIRA, 2007<sup>b</sup>). Desta maneira, um animal será mais fértil quanto maior for a quantidade de espermatozoides que se deslocam velozmente (ELLIOT et al., 1973 *apud* VIDIGAL, 2008).

Com o intuito de promover melhorias na avaliação da motilidade, vários diluentes de sêmen vêm sendo testados com taxas de diluição de 1:2 por diversos pesquisadores. Os diluentes impedem a aglutinação, além de diminuir a ação da concentração espermática e do pH seminal a respeito da avaliação subjetiva da motilidade (LAGARES et al., 2000).

A motilidade espermática pode ser avaliada de modo subjetivo ou utilizando-se o Computer-assisted sperm analysis (CASA), que tem um papel importante e crescente para a garantia da qualidade de produto de sêmen comercializados para inseminação artificial de bovinos, equinos e suínos.

### **2.3.2. Teste de Termo Resistência Lento (TTR)**

Para avaliar a longevidade dos espermatozoides diluídos e congelados-descongelados, desde 1998 o CBRA recomenda o uso do TTR como teste complementar para avaliação do sêmen das diferenças espécies de animais (OLIVEIRA, 2010).

O TTR avalia a motilidade e o vigor espermáticos no tempo zero (momento quando o sêmen é descongelado) e em períodos de tempo que variam de 30 a 90, 180 e 240 minutos (FURST, 2006; OLIVEIRA, 2010). Segundo Aidar (2013), os fatores que podem influenciar no resultado deste

teste podem ser: efeito do ejaculado, método de congelamento e efeitos do tempo incubação.

### **2.3.3. Teste hiposmótico (Host)**

As membranas biológicas realizam trocas realizadas com o meio externo, sendo responsáveis pela homeostase celular. A membrana forma uma barreira semipermeável para moléculas, o que permite manter e modular a composição do meio intracelular. Além disso, esta promove proteção à célula contra as influências do ambiente extracelular, tanto no trato genital masculino, até os espermatozoides serem ejaculados, como no trato genital feminino, até ocorrer à fertilização (TERRACIANO, 2008).

Neste contexto, o teste hiposmótico avalia a funcionalidade das membranas espermáticas, podendo ser realizado utilizando água destilada como solução hiposmótica. Sendo este considerado um teste de fácil execução e baixo custo, o que proporciona subsídios na avaliação da viabilidade espermática (LINDEN, 2012).

De acordo com Chapon (2011), o primeiro teste hiposmótico foi realizado em espermatozoides humanos, com objetivo de avaliar a função bioquímica da membrana espermática intacta. Ainda de acordo com este autor, o teste permite observar o comportamento do espermatozoide, apresentando membrana celular íntegra, quando submetido à solução hiposmótica, onde permite a passagem de água através da membrana, até o restabelecimento do equilíbrio osmótico. O influxo de água para o interior das células ocasiona um aumento de volume celular (edema), causando, assim, o dobramento da cauda em espermatozoides que possui a membrana funcionalmente intacta.

### **2.3.4. Teste supravital (vivos e mortos)**

Ker (2010) relatou que o teste supravital foi o primeiro desenvolvido para avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática do espermatozóide. Este é também conhecido como o teste de vivos e mortos, o qual consiste na utilização de corantes derivados da fluoresceína, sendo a eosina o mais utilizado, tendo como opção a adição da nigrosina como corante de fundo. A avaliação da integridade da membrana se baseia no fato de que a membrana plasmática íntegra pode prevenir a entrada do corante no

citoplasma celular. Desta maneira, a eosina penetra pela membrana lesionada dos espermatozoides e cora o interior do núcleo em vermelho, permitindo identificar os espermatozoides mortos. É considerada uma técnica rápida, de fácil manipulação o que dispensa o uso de microscópio especial.

### **2.3.5. Teste com sondas fluorescentes**

O potencial de fertilização do espermatozoide depende da integridade e funcionalidade de suas diferentes estruturas. Por isto, é difícil o desenvolvimento de um único teste laboratorial para determinar a fertilidade seminal (GARCIA, 2005). Deste modo, corantes fluorescentes (sondas epifluorescentes ou fluorocromos) são indicadores sensíveis e específicos da condição subcelular e podem ser aplicados para mensurar alterações estruturais e metabólicas no interior das células (PEREIRA et al., 2012).

As técnicas que utilizam corantes fluorescentes estão se tornando mais importantes, uma vez que possuem característica de apontar estruturas específicas das células, como também de promover a detecção da integridade ou funcionalidade de forma clara (CELEGHINI, 2005).

A avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozoide pode ser feita utilizando-se sondas fluorescentes, como o iodeto de propídio; o brometo de etídio; corantes supravitais Hoechst; 33342 (H342); SYBR-14 e diacetato de carboxifluoresceína (OLIVERA, 2010). O iodeto de propídio é uma das mais utilizadas por sua facilidade de preparação e aplicação e pode ser utilizada sozinha ou associada a outro corante fluorescente. Devido à sua afinidade com o DNA ela cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003; CELEGHINI, 2005). O SYBR-14 tem especificidade ao DNA, atravessa a membrana plasmática íntegra e cora o núcleo dos espermatozoides em verde (PEREIRA et al., 2012).

### **2.3.6. Ligação de oócitos à membrana perivitelina (MPV) da gema de ovo de galinha**

A capacidade fecundante dos espermatozoides pode ser avaliada pelo teste de ligação ao oócito, de forma que o teste de penetração *in vitro* (PIV) em oócitos simula os processos envolvidos no mecanismo de fertilização (BERNARDI, 2008), podendo também ser baseado na capacidade de ligação de espermatozoides à membrana perivitelina (MPV) do ovo de galinha,

simulando a interação dos gametas (CORCINI, 2010) sendo, portanto, um teste mais eficiente para se verificar a habilidade dos espermatozoides em sofrer a reação acrossomal (CORCINI et al., 2012).

A ligação dos espermatozoides de outras espécies a MPV do ovo de galinha ocorre devido às similaridades entre as glicoproteínas da zona pelúcida e da MPV da gema de ovo de galinha (BARBATO et al., 1998; MUGNIER et al., 2009).

### **2.3.7. Morfologia espermática**

Os primeiros estudos sobre a patologia do sêmen foram realizados em touros (WILLIANS e SAVAGE, 1925 *apud* CANISSO et al., 2008). A morfologia espermática dos equídeos demonstra semelhança com as demais espécies, entretanto, a cabeça do espermatozoide apresenta formato assimétrico, acrossoma relativamente pouco desenvolvido, enquanto a inserção abaxial da cauda é considerada normal (CANISSO et al., 2008).

Um dos principais parâmetros de avaliação da qualidade espermática é a sua morfologia, uma vez que, deformidades na célula espermática podem conferir diminuição na capacidade de fertilização do espermatozoide. Em ejaculados de garanhões, a presença de diversas anormalidades da morfologia espermática pode ser considerada como normal (KAVAK et al., 2004; PUGLIESI, 2009).

A avaliação andrológica de reprodutores de todas as espécies no Brasil segue as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), onde a classificação das anormalidades espermáticas é dividida em defeitos maiores e defeitos menores.

## **2.4. Criopreservação**

A criopreservação de sêmen é considerada uma importante ferramenta no melhoramento genético e preservação da raça equina, seja pela maximização na utilização do potencial genético do reprodutor, ao permitir um maior número de descendentes de animais de alto mérito genético, seja pela



diminuição nos custos na aquisição e no transporte dos animais e no controle de doenças sexualmente transmissíveis, bem como por contribuir na formação de um banco genético disponível por tempo indeterminado (VIDAMENT et al., 1997; SAMPER; HANKINS, 2001; PUGLIESI; FÜRST; CARVALHO, 2012).

A ausência de seleção genética para características de fertilidade e resistência espermática à congelação como de fatores biofísicos e bioquímicos característicos dos espermatozoides parecem ser os responsáveis pelos insucessos observados na espécie equina (SAMPER; HANKINS, 2001; VARNER, 2003; LOOMIS; GRAHAM, 2008).

Como já mencionado anteriormente por Rates (2011), os lipídios e as proteínas de membrana permanecem em estado de fluidez, onde esses são capazes de moverem uns entre os outros bilateralmente. Durante o processo de criopreservação, o sêmen deve ser a princípio, resfriado, passando de 37 °C, à 20 °C. Ainda segundo este autor, ao passar pelo processo de resfriamento, chegando a níveis inferiores a 5 °C, o meio que circunda o espermatozoide e estes sofrem um super-resfriamento. Os mesmos também concluíram que, de -6°C a -15°C, a água no meio começa a cristalizar e a concentração de soluto na fração descongelada aumenta, elevando a pressão osmótica no espaço extracelular. Nesse intervalo, a membrana plasmática inibe a formação de cristais de gelo intracelular, fazendo com que a água dentro da célula espermática permaneça descongelada. Este autor ainda relata que existem canais de água descongelada com a temperatura -196°C, contendo altas concentrações de sais. Desta maneira, somente os espermatozoides que se encontram nesses canais sobrevivem ao processo de criopreservação, quando a temperatura crítica esta de 60°C. Com relação ao acondicionamento em nitrogênio líquido, os espermatozoides são relativamente inertes a este processo.

### **3. JUSTIFICATIVA**

Dentre as biotécnicas utilizadas na reprodução animal que promovem um melhoramento genético, destaca-se a inseminação artificial (IA), que consiste em aumentar o número de descendentes de um macho excepcional. Porém, a variação da resposta à criopreservação é muito grande, o que explica o interesse de diversos pesquisadores em encontrar novos protocolos de congelação/descongelação e de estudar as alterações na membrana plasmática e acrossoma do espermatozoide. Portanto, é importante solucionar estes entraves na disseminação desta biotécnica na espécie equina, para que produtores possam utilizar o sêmen de animais geneticamente superiores para melhorar o desempenho e preservar a raça, seja de animais utilizados para trabalho, esporte, lazer ou equoterapia, provendo, assim, a geração de empregos para o homem do campo e evitando o êxodo rural.

A despeito da importância do cavalo Nordestino para a região Nordeste e da necessidade de se promover seu melhoramento genético e preservação, inexistem estudos sobre seu perfil seminal e resposta do sêmen à criopreservação ou mesmo sobre a taxa de prenhez e de mortalidade embrionária após IA com sêmen congelado/descongelado, sendo, portanto, uma fonte imensa de material para outros trabalhos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

Este estudo objetivou avaliar as características do sêmen à fresco e congelado-descongelado de garanhões da raça Nordestina.

### **4.2. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos foram avaliar em garanhões da raça Nordestina:

- Os parâmetros físicos do sêmen fresco;
- A motilidade total e progressiva do sêmen diluído e descongelado pelo CASA;
- A motilidade total e progressiva do sêmen diluído e descongelado submetidos ao teste de termo resistência lento pelo CASA;
- A integridade funcional espermática do sêmen descongelado submetido ao teste hiposmótico;
- A integridade estrutural da membrana plasmática do espermatozoide utilizando-se o teste supravital;
- A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides descongelados utilizando-se o teste com sondas fluorescentes;
- A habilidade do espermatozoide se ligar a membrana de oócitos através do teste de ligação à membrana perivitelina (MPV) da gema do ovo de galinha;
- A morfologia espermática utilizando-se preparação úmida.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local das coletas de sêmen e análises seminais**

As coletas de sêmen foram realizadas durante a estação reprodutiva de 2013/2014 na fazenda da Associação Brasileira de Criadores do Cavalo Nordestino em Juazeiro – BA, localizada a 09°25'00" de latitude S e 40°30'00" de longitude O, altitude de, aproximadamente, 371 metros, temperatura média anual de 24,2°C e precipitação anual em torno dos 430 mm.

As análises seminais foram realizadas no Centro de Pesquisa em Suínos, Espécies Nativas e Silvestres (CPSENS) da UNIVASF, localizado no *Campus* de Ciências Agrárias em Petrolina - PE.

### **Animais**

Foram utilizados dois garanhões da raça Nordestina clinicamente saudáveis e de fertilidade comprovada, com idade média de 9,5 anos. Os animais foram mantidos em baias individuais, e a dieta consistia de ração industrializada (Durancho® 12MA) e volumoso capim bermuda vaqueiro (*Cynodon dactylon*), capim-cameron (*Pennisetum purpureum*) picado. Sal mineral e água foram fornecidos *ad libitum*.

O esgotamento das reservas espermáticas extragonadais foi realizado utilizando-se três coletas seminais diárias, por oito dias. Dois dias após a última foram iniciadas as coletas de sêmen do animal 01 (N= 10 ejaculados) e do animal 02 (N= 9 ejaculados), tendo sido obtidos três ejaculados por semana de cada animal, perfazendo um total de 19 ejaculados. Para isto, utilizou-se uma vagina artificial (Hannover®, Biotech, Botucatu, SP, Brasil) e uma fêmea em estro natural ou induzido como manequim.

### **Processamento das amostras**

Após a coleta, o ejaculado foi filtrado com auxílio de um filtro de nylon e o volume determinado por visualização direta do sêmen em tubo falcon graduado. Em seguida, avaliou-se o sêmen quanto as características físicas

(cor, odor e aspecto) e, sob microscopia convencional, a motilidade total e vigor.

Após o exame macroscópico, o sêmen foi diluído na proporção de 1:1 com diluidor de transporte (Botu-Semen<sup>®</sup>, Biotech Botucatu, Botucatu, SP, Brasil) pré-aquecido a 37°C, homogeneizado e encaminhado para o laboratório CPSENS protegido da luz.

No laboratório, o sêmen foi submetido à centrifugação em tubos cônicos (50 mL) a 2200 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e a concentração espermática determinada utilizando um espectrofotômetro (Spermacue<sup>®</sup>, Minitub, Berlim, Alemanha). Para isto, utilizou-se uma cubeta contendo 3 mL de água destilada e 120 µL de sêmen para alcançar a concentração de  $10 \times 10^6$  espermatozoides.

Em seguida, os “*pellets*” foram ressuspensos no diluidor de congelação (Botu-crio<sup>®</sup>, Biotech Botucatu, Botucatu, SP, Brasil), pré-aquecido a 37°C, até a concentração de  $10^6$  espermatozoides/ml e avaliados quanto às motilidades total (MT) e progressiva (MP). Ejaculados com pelo menos 70,00% de MT foram submetidos à congelação (CBRA, 2013).

O envase foi realizado em palhetas de 0,5 mL lacradas com selador palhetas (Ultras Seal<sup>®</sup>, Minitub, Berlim, Alemanha), as quais foram estabilizadas na câmara fria (Gemar<sup>®</sup>, Gefrio, Fortaleza, CE, Brasil) a 5°C, por 20 minutos. Em seguida realizou-se o resfriamento rápido utilizando-se o vapor de nitrogênio líquido por 15 minutos em uma caixa de isopor térmica, também dentro da câmara fria. Posteriormente as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e, então, armazenadas à -196°C, para posterior análise.

Para realizar as análises do sêmen criopreservado, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C, por trinta segundos (DELL'AQUA JUNIOR, 2000).

### **Avaliação da Motilidade Total (MT) e Progressiva (MP) no CASA**

Uma palheta de cada ejaculado foi destinada à análise computadorizada (CASA<sup>®</sup>; MINITUB, Berlin, Alemanha) utilizando-se o programa de análise de sêmen (*Spermvision*<sup>®</sup>; Minitub, Berlin, Alemanha). Amostras de 8,0 µL de cada ejaculado diluído e congelado-descongelado foram colocados entre lâmina e

lamínula, pré-aquecidas a 37°C, e avaliadas quanto às motilidades total (MT, %) e progressiva (MP, %).

### **Teste de Termo Resistência Lento (TTR)**

A longevidade dos espermatozoides diluídos e congelados-descongelados foi avaliada pelo teste de termoresistência lento (TTR). O teste consistiu no acondicionamento de 1,0 mL da amostra de sêmen em tubos plásticos de 1,5 mL em banho-maria a 37°C por 150 minutos. Foram realizadas avaliações da MT e MP no CASA, sendo as leituras realizadas nos tempos 0, 10, 30, 150 minutos de incubação.

### **Teste hiposmótico (HOST)**

A integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide foi avaliada através do teste hiposmótico (HOST) em câmara úmida, incubando-se em banho-maria a 37°C por 30 minutos 100 µL de sêmen congelado-descongelado diluídos em 1,0mL de solução à base de citrato de sódio e frutose a 125 mOsm/L (MELO; HENRY; BECKER, 2005). Após esse período, 15 µL dessa solução foram avaliados em câmara úmida sob microscopia de contraste de fase em aumento de 400x. Foram contadas 100 células, considerando-se a presença ou ausência de cauda enrolada (NEILD et al. 2000), O cálculo da reação da reação hiposmótica foi realizado pela fórmula:  $HOST = (\% \text{ de caudas enroladas após o HOST}) - \% \text{ de caudas enroladas antes do HOST}$  conforme Melo; Henry (1999).

### **Teste supravital (vivos e mortos)**

A integridade estrutural da membrana plasmática do espermatozoide foi avaliada utilizando-se o teste supravital com o corante eosina-nigrosina a 0,5%. Amostras de 10 µL de sêmen foram incubadas com 10 µL de corante sobre lâmina de vidro aquecida a 37 °C por 3 min. Após incubação confeccionou-se um esfregaço para realização da leitura sob microscopia óptica comum em aumento de 400x. Foram contados 100 espermatozoides e classificados como vivos os que não se coraram e como mortos aqueles com o núcleo corado de vermelho (DOTT & FOSTER, 1972).

### **Teste com sonda fluorescente**

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática dos espermatozoides descongelados utilizou-se a associação de duas sondas fluorescentes, o iodeto de propídio e SYBR-14. Uma amostra de 0,5 mL de sêmen congelado-descongelado foi colocada em tubos plásticos de 1,5 mL juntamente com 0,5 mL de STALP, 5 µL de SYBR-14 (solução de 20 µM em Me<sub>2</sub>SO) e 10 µL de iodeto de propídio (solução de 2,4 mM em água; Molecular Probes, Eugene OR) como descrito por Garner et al. (1994). A amostra foi incubada à temperatura ambiente por 8 minutos ao abrigo de luz. Após incubação uma alíquota de 6,5 µL da solução foi utilizada para preparo da câmara úmida, entre lâmina e lamínula, pré-aquecida a 37°C. A leitura foi realizada em microscopia de fluorescência (AXIO Imager. A2 - ZEISS®, Berlin, Alemanha). Nas leituras identificaram-se um mínimo de 200 células por amostra e o padrão de emissão de fluorescência foi: membrana plasmática lesada – vermelho fluorescente (Iodeto de propídio); membrana plasmática intacta – verde fluorescente (SYBR-14).

### **Ligação de oócitos à membrana perivitelina (MPV) da gema de ovo de galinha**

A habilidade do espermatozoide equino se ligar a membrana de oócitos foi analisada utilizando-se a membrana perivitelina (MPV) da gema de ovo de galinha, como descrito por Barbato; Cramer; Hammerstedt (1998) modificado por Moraes et. al (2010). A MPV foi preparada pela separação da gema da clara do ovo, com a remoção do excesso de clara utilizando um papel-filtro. A gema intacta foi colocada sobre um pedaço de parafilme e sua membrana foi delicadamente rompida e lavada várias vezes com STALP. Posteriormente, a membrana foi espalhada delicadamente em uma placa petri e cortada em pequenos quadrados (1 x 1 cm) utilizando-se uma cubeta de espectrofotômetro como modelo, sendo cada pedaço colocado em um tubo de cultura (16 x 100 mm) contendo 1 mL de meio de incubação (STALP).

As membranas com 50.000 espermatozoides foram incubadas por 2 horas a 37°C numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 30 minutos, os tubos foram agitados para manter a membrana aberta. Meia hora antes do final da incubação, acrescentou-se 1 µL de Hoechst 33342 (1 mg/mL de água) para

corar o núcleo dos espermatozoides. Depois da incubação, cada membrana foi colocada em um tubo contendo 1,0 mL de STALP e as membranas foram lavadas cinco vezes para remoção dos espermatozoides que não se ligaram. Na sequência, cada membrana foi colocada sobre uma lâmina e gentilmente aberta para serem removidas quaisquer dobras. As lâminas foram cobertas com lamínulas e analisadas utilizando-se microscópio de epifluorescência. Foi determinado o número de espermatozoides ligados à membrana, contando-se seis campos aleatórios de cada membrana, e o número médio de espermatozoides ligados por membrana foi calculado.

### **Avaliação da morfologia espermática**

A morfologia espermática foi avaliada no sêmen diluído utilizando-se microscópio de luz com contraste de fase (200x) através da técnica de preparação úmida. Para tanto uma alíquota de 10 µL de sêmen foi adicionada à 1,0 mL de formol-salino tamponado aquecido a 37°C e estocada à temperatura ambiente para posterior análise. Posteriormente foram feitas lâminas pelo método da câmara úmida onde foram contadas 200 células no aumento de 1000x. Os defeitos espermáticos totais foram subdivididos em defeitos maiores e menores de acordo com o CBRA (2013).

### **Análise Estatística**

Os dados foram comparados pela ANOVA com post hoc teste de Student Newman Keul a 5% de significância (SAEG, UFV, 1997). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas (CEDEP) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, sob o de protocolo número 0006/161012.



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Severo (2009) relata que a avaliação do sêmen é muito importante para determinar sua qualidade. Para tanto, é necessário que os espermatozoides apresentem características físicas e morfológicas adequadas para que ocorra a fertilização. Os ejaculados avaliados neste estudo estavam dentro dos valores e padrões considerados normais para equinos (CBRA, 2013), pois apresentaram volumes médios de  $29,83 \pm 12,60$  mL, coloração branca acinzentada a leitosa e odor *suís-generis*. O volume médio observado no sêmen fresco foi superior ao descrito nas raças Quarto de Milha ( $23,33 \pm 2,25$  mL) e Mangalarga Marchador ( $24,16 \pm 2,47$  mL) (COSTA et al., 2014) e inferior ao de jumento Pêga ( $42,2 \pm 18,9$  mL) (OLIVEIRA, 2010) e Mangalarga Marchador ( $44,17 \pm 26,52$  mL) (CANDEIAS, 2010).

A motilidade total do sêmen fresco foi, em média, de 80,91 % e o vigor espermático, em média, três. A motilidade e o vigor espermáticos apresentaram-se dentro do preconizado pelo CBRA (2013), para fins de congelação e comercialização do sêmen (motilidade  $\geq 70,0\%$  e vigor  $\geq 3$ ). Os valores de motilidade e vigor de garanhões da raça Nordestina foram superiores aos observados em Quarto de Milha ( $67,50 \pm 0,91\%$  e  $2,87 \pm 0,05$ ) e Mangalarga Marchador ( $62,9 \pm 6,78\%$  e  $2,58 \pm 0,32$ ) (COSTA et al., 2014) e semelhantes aos de jumento Pêga ( $83,00 \pm 2,5\%$  e  $3,90 \pm 0,1$ ) (OLIVEIRA, 2010) e Mangalarga Marchador ( $83,54 \pm 8,14\%$  e  $3,63 \pm 0,49$ ) (CANDEIAS, 2010).

### **Avaliação da Motilidade Total (MT) e Progressiva (MP) no CASA**

A avaliação de múltiplas características espermáticas em uma única amostra de sêmen com alto grau de acurácia e repetibilidade pode ser realizada através do sistema automatizado de análise de motilidade (CASA) (MORTIMER; MAXWELL, 2004). A vantagem deste sistema de avaliação é a diminuição de erros e, por sua objetividade, permite avaliações adicionais tais como a velocidade e o tipo de trajetória dos espermatozoides. Contudo, esta

técnica de avaliação tem como desvantagem os altos custos de cada avaliação (SQUIRES et al., 1999; AURICH, 2005).

A MT do sêmen diluído ( $72,15 \pm 9,34$ ) foi maior ( $P < 0,05$ ) que a do sêmen descongelado ( $34,08 \pm 12,57$ ). O mesmo ocorreu com a MP ( $59,24 \pm 11,45$  e  $20,53 \pm 12,82$ , sêmen diluído e descongelado, respectivamente). A queda na MT pós-descongelação observada na raça Nordestina foi inferior à descrita no sêmen de garanhões Quarto de Milha e Mangalarga Marchador criopreservado com Botu-crio®, enquanto que a queda na MP foi inferior à observada em Quarto de Milha e superior à de Mangalarga Marchador (COSTA et al., 2014).

Segundo Alvarenga et al. (2003), as raças brasileiras, em particular, Mangalarga e Mangalarga Marchador, são menos resistentes ao processo de congelamento, possivelmente devido a fatores genéticos (ALVARENGA; PAPA, 2011). Todavia, Alvarenga et al. (2005) e Oliveira; Rubins; Silva (2013) observaram que diluentes contendo amidas em sua fórmula, a exemplo do Botu-crio®, fornecem bons resultados na preservação do sêmen de equinos do que os diluidores contendo alta concentração ou somente glicerol como crioprotetor. Este fato tem sido atribuído à melhor permeabilidade das aminas na célula espermática e, portanto, a injúrias menores (ALVARENGA; PAPA, 2011).

Medeiros et al. (2002) comparando crioprotetores com diferentes concentrações de amida (3 a 5%) e a base de glicerol observaram MT de 49 a 52% e MP de 10 a 15% para os a base de amida e de 27% e 8%, respectivamente, para o a base de glicerol.

### **Teste de Termo Resistência Lento (TTR)**

As médias de MT e MP, tanto do sêmen diluído quanto do pós-descongelamento, submetidos ao TTR estão exibidas na Tabela 1. Observou-se que, tanto a MT quanto a MP no tempo 0 foram superiores às observadas no tempo de 150 min ( $P < 0,05$ ). Isto indica que a manutenção do sêmen equino em contato com o diluente de congelamento até 10 ou 30 minutos após o resfriamento a 5°C não interferiu na capacidade de movimentação e velocidade de progressão da célula espermática.

Costa et al. (2014) não observaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) aos 60 minutos de incubação, todavia a partir do tempo 120 minutos houveram diferenças ( $P < 0,05$ ) na motilidade espermática. Pugliesi et al. (2014) não observaram diferenças ( $p > 0,05$ ) quanto à motilidade progressiva durante o TTR, nos tempos de 0, 20, 40, 60 e 90 minutos em Mangalarga Marchador, contudo observaram perda de 18,4% da motilidade progressiva do sêmen descongelado ao tempo 0 do TTR em comparação ao sêmen fresco (67,7% vs. 49,3%), enquanto que Furst (2006) observou perdas de 28,6% no T0 e ao final do TTR (90 minutos) este valor não ultrapassou 50,0%.

Neste estudo a queda da MT e MP do sêmen descongelado ao tempo 0 do TTR em comparação ao sêmen fresco foi mais acentuada (41,05% e 41,52%, respectivamente), assim como ao final do TTR (150 minutos 40,34% e 33,56%). Esta diminuição na integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide ocorreu devido aos danos causados pelo processo de criopreservação nas estruturas e organelas envolvidas na movimentação espermática (Watson, 1995 apud Pugliesi et al., 2014), indicando que o sêmen descongelado não suportou o estresse térmico promovido durante o TTR e, portanto, não estava apto para ser utilizado na técnica de inseminação artificial.

**Tabela 1** – Médias de motilidade espermática total e progressiva de garanhões da raça Nordestina após o teste de termo resistência (TTR). Petrolina, al. (2013/2014).

Motilidade	Sêmen diluído			
	0	10	30	125
Total	71,29±2,11 <sup>A</sup>	68,41±2,57 <sup>AB</sup>	66,20±2,64 <sup>AB</sup>	54,52±5,01 <sup>B</sup>
Progressiva	58,62±2,99 <sup>A</sup>	55,10±2,96 <sup>A</sup>	52,24±3,50 <sup>A</sup>	39,00±5,22 <sup>B</sup>
Motilidade	Sêmen descongelado			
	0	10	30	125
Total	30,24±3,07 <sup>A</sup>	26,10±3,30 <sup>AB</sup>	23,64±3,13 <sup>AB</sup>	14,18±2,90 <sup>B</sup>
Progressiva	17,10±2,83 <sup>A</sup>	12,88±2,78 <sup>AB</sup>	11,83±3,02 <sup>AB</sup>	5,44±1,53 <sup>B</sup>

<sup>A,B</sup> Valores diferem pelo teste de Student Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ).

### **Teste hiposmótico (HOST)**

A integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide é fundamental para que ocorra a capacitação espermática, reação acrossômica e a fusão do espermatozoide com ovócito (MAFFILI et al., 2003; SIQUEIRA et al, 2007), e para a manutenção e sobrevivência da célula espermática no genital feminino (SQUIRES et al, 1999). Para avaliação da integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide Jeyendran et al. (1984) propuseram o uso do teste de estresse hiposmótico (HOST) que avalia a capacidade do espermatozoide de reagir em um meio hiposmótico quando este possui a membrana plasmática funcionalmente ativa (FURST, 2006).

Os valores percentuais da integridade funcional espermática do sêmen imediatamente pós-descongelamento (0 mOsm) e após o teste hiposmótico (125 mOsm) foram, respectivamente,  $40,61 \pm 7,97\%$  e  $54,82 \pm 9,09\%$ , tendo havido  $14,21 \pm 1,12\%$  de reativos ao HOST. Estes resultados diferiram de Oliveira (2011) que verificou queda acentuada no percentual de células reativas ao teste hiposmótico entre as amostras avaliadas imediatamente após a colheita e após a refrigeração. Em jumentos Canisso et al. (2008) utilizando solução de sacarose 100 mOsm e incubação por 60 minutos em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  observaram  $42,62 \pm 5,11\%$  de resposta ao HOST, enquanto que Costa et al. (2014) observaram  $17,79 \pm 1,86\%$  em Quarto de Milha e  $12,00 \pm 1,69\%$  em Mangalarga Marchador e Pugliesi et al (2014)  $27,3\%$ . Os valores observados neste estudo refletiram a superioridade da qualidade da membrana plasmática do sêmen do cavalo Nordeste após o descongelamento em relação ao sêmen fresco e indicaram que o processo de congelamento do sêmen não promoveu danos à funcionalidade desta membrana do sêmen equino.

### **Teste supravital (vivos e mortos)**

A integridade estrutural da membrana plasmática foi avaliada utilizando-se a coloração supravital com o corante eosina-nigrosina. A porcentagem de células espermáticas coradas pela eosina após descongelamento do sêmen foi de  $37,78 \pm 9,06\%$  e de não coradas, portanto viáveis, foi de  $62,22 \pm 9,06\%$  ( $P < 0,05$ ), demonstrando assim que o diluente utilizado promoveu bons resultados. A porcentagem de células viáveis observada neste estudo foi semelhante aos  $68,8\%$  observados por Pugliesi et al. (2014) e superior aos

36,15% descritos por Furst (2006); aos  $32,5 \pm 13,1\%$  por Oliveira (2010) e aos 49,3% de Flores et al. (2008). Portanto, os valores observados neste estudo refletiram a superioridade da qualidade da membrana plasmática do sêmen do cavalo Nordestino após o descongelamento e indicaram que o processo de congelamento não promoveu danos à integridade estrutural da membrana plasmática.

De acordo com BRITO et al., (2003), a coloração supravital resulta em uma proporção superestimada de espermatozoides com membrana íntegra em comparação ao HOST, uma vez que avalia apenas os danos físicos à membrana, enquanto o HOST avalia também a atividade bioquímica, demonstrando que nem sempre um espermatozoide com integridade física tem integridade funcional. Neste estudo o espermatozoide mostrou tanto integridade estrutural quanto funcional após o descongelamento.

### **Teste com sonda fluorescente**

A porcentagem de viabilidade do sêmen descongelado avaliado pela sonda SYBR-14 foi, em média, de  $76,97 \pm 29,74\%$ . Espermatozoides com membranas viáveis avaliados com o SYBR-14 apresentaram fluorescência verde nítida, facilmente identificada quando contrastada com os espermatozoides mortos corados em vermelho pelo iodeto de propídio. Portanto, o uso combinado das duas sondas pode ser vantajoso (Garner et al.1994).

Observou-se maior nível de detecção da integridade de membrana plasmática dos espermatozoides com a SYBR-14 em comparação com HOST, concordando com Pereira et al. (2012). Portanto, as sondas de epifluorescência podem ser usadas na avaliação de sêmen bubalino, com destaque para SYBR-14 que foi mais sensível que o iodeto de propídio e o HOST para avaliar a integridade de membrana plasmática.

### **Ligação de oócitos à membrana perivitelina (MPV) da gema de ovo de galinha**

A função da membrana plasmática do espermatozoide é promover o transporte seletivo de moléculas para a correta funcionalidade celular. A sua integridade assegura a ocorrência das reações necessárias para que se dê à

união do espermatozoide ao oócito, formando o zigoto (PUGLIESI; FURST; CARVALHO, 2012). Deste modo, o teste de ligação do espermatozoide à membrana perivitelina da gema de ovo permite avaliar a capacidade fecundante da célula espermática (Barbato et al. 1998) e, também indiretamente, os eventos bioquímicos relacionados à fertilização (capacitação e reação acrossomal) (Amorim 2008). Por isso é considerado um valioso teste na análise da eficácia do processo de criopreservação do sêmen.

O número médio de espermatozoides ligados à MPV após a descongelção do sêmen foi de  $230,39 \pm 57,09$ . Em caprinos Dias et al. (2013) encontraram  $253,3 \pm 156,2$  espermatozoides.

### **Avaliação da morfologia espermática**

A Tabela 2 exibe o percentual médio de anormalidades espermáticas observadas no sêmen descongelado de garanhões da raça Nordestina. O principal defeito maior observado foi cauda fortemente dobrada seguida pela gota citoplasmática proximal, enquanto que os defeitos menores foram representados principalmente por cauda dobrada simples, cabeça delgada e cabeça alongada. Pugliesi et al. (2014) observaram alta porcentagem de anormalidades do acrossoma tanto no sêmen fresco ( $4,6 \pm 3,4\%$ ) quanto no descongelado ( $7,2 \pm 3,4\%$ ).

A média percentual dos defeitos totais foi de  $5,86 \pm 2,72\%$ , sendo  $2,12 \pm 1,29\%$  de defeitos maiores e  $3,74 \pm 1,43\%$  de defeitos menores. Segundo o CBRA (2013), o sêmen dos animais analisados poderia ser comercializado, pois não apresentou defeitos totais inferiores a 30%. As médias de defeitos totais, maiores e menores observados foram significativamente inferiores aos descritos por Costa et al. (2014) nas raças Quarto de Milha ( $25,86 \pm 1,54$ ;  $6,05 \pm 0,52$  e  $18,51 \pm 1,43$ , respectivamente) e Mangalarga Marchador ( $30,35 \pm 3,67$ ;  $3,64 \pm 0,68$  e  $22,04 \pm 4,60$ ) e por Araújo e Araújo (2010) na raça Pônei brasileira ( $37,12\%$ ;  $28,94\%$  e  $8,28\%$ ). Riba (2006) observou na raça Pantaneira  $23,31 \pm 0,24\%$  de defeitos totais.

**Tabela 2** – Percentual médio de anormalidades espermáticas observadas no sêmen descongelado de garanhões da raça Nordestina. Petrolina, 2013/2014

<b>Anormalidades Espermáticas</b>	<b>Defeitos Maiores</b>
Acrossoma incompleto	1,31 ± 1,19 <sup>c</sup>
Cabeça isolada	1,69 ± 1,49 <sup>c</sup>
Gota citoplasmática proximal	2,58 ± 1,63 <sup>b</sup>
Cauda fortemente dobrada	4,14 ± 2,31 <sup>a</sup>
Cauda dobrada com gota	0,89 ± 0,82 <sup>c</sup>
Total	2,12 ± 1,93
<b>Anormalidades Espermáticas</b>	<b>Defeitos Menores</b>
Cabeça delgada	4,58 ± 2,09 <sup>ab</sup>
Cabeça alongada	3,86 ± 1,78 <sup>b</sup>
Cauda dobrada simples	5,14 ± 1,93 <sup>a</sup>
Gota citoplasmática distal	1,39 ± 1,34 <sup>c</sup>
Total	3,74 ± 2,29
<b>Defeitos totais</b>	<b>5,86 ± 4,22</b>

P<0,05)

## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As características avaliadas no sêmen de garanhões da raça Nordestina mantiveram-se dentro dos valores considerados normais para espécie. Estas juntamente com os resultados do teste de ligação serão um referencial para a raça em estudos futuros uma vez que, inexistem dados comparativos para esta raça.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DO CAVALO NORDESTINO – ABCCN. Regulamento do registro genealógico do cavalo nordestino. p. 33, Recife, 1987.

AGROCAVE. **Raças de animais**, 2014. Disponível em: <<http://www.agrocave.com.br/racas1.php?codigo=120733599518356>>. Acesso em 15 Maio, 2014.

ALVARENGA, M.A., LEÃO, K.M., PAPA, F.O., LANDIM-ALVARENGA, F.C., MEDEIROS, A.S.L., GOMES, G.M. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. **Proceedings...** of the Havemeyer Foundation Workshop on Transporting Gametes and Embryos, Massachusetts, USA, October, p. 74-76. 2003.

ALVARENGA, M. P.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 105-113, 2005

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Principais avanços no processamento e aplicação do sêmen congelado de equinos. **SPERMOVA**, v.1, n.1, p.7-10, 2011.

ALMEIDA, J. L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal criopreservação do sêmen equino**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária de Brasília, 2006.

AMORIM, E.A.M. Alteração da membrana espermática de suínos , bovinos e equinos na qualidade do sêmen. 174 f. 2008. Tese (Doutorado), Universidade federal de Viçosa, MG, 2008.

AMORIM, E. A. M.; GRAHAM, J. D.; MEYERS, M.; SPIZZIRI, B. Delivering Cholesterol or Desmesterol to Bull Sperm Membranes Improves Cryosurvival. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYOS TRANSFER SOCIETY (IETS), 34, Denver – CO – EUA, January 5-9, 2008. **Proceedings...** The Journal of Reproduction, Fertility & Development;

ANTUNEZ, L.; HARTWIG, F. P.; SANTOS, R. S.; BIANCHI, I.; CURCIO, B. R. **Relação entre taxa de prenhez por ciclo, motilidade e Testes de fluorescência espermática em equinos da raça Crioula.** In: XIX CIC – XII ENPOS – Mostra Científica, 2010.

ARAÚJO, A. M. S.; ARAÚJO, S. A. C. Alterações Morfológicas Encontradas nas Células Espermáticas de Garanhões Pônei. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária.** Ano III. n. 15, Julho, 2010.

ARAÚJO, R. Nordeste: Um herói do sertão. **Agropecuária Tropical**, n.30, p.41-43. 1983.

ARRUDA, R. P. DE; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.8-16, 2007.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEME S,K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n.2, p. 145-151, 2011.

ARBATO, G.F.; CRAMER, P.G.; HAMMERSTEDT, R.H. **A practical *in vitro* sperm-egg binding assay that detects subfertiles males.** Biology of Reproduction, Champaign, v.58, p.686-699, 1998.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.

BECK, S. L. **Pantaneiro, Nordestino e Marajoara, raças brasileiras pouco conhecidas.** In\_ **Equinos: raças, manejo e equitação.** p. 179-190. São Paulo: Criadores, 1985.

BRANDÃO, A.C. **Efeito do laser diodo sobre as características de motilidade, de integridade das membranas plasmáticas e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide criopreservados de equinos.** Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2008.

BRINSKO, S.P.; ROWAN, K.R.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1641-55, 2000.

CANDEIAS, L. M. **Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça manga larga machador.** 2010. f 105. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2010.

CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; KER, P. G.; RODRIGUES, A. L.; SENA, T. C.; CARVALHO, G. R. Coleta de sêmen de jumentos (*Equus asinus*) utilizando-se éguas em estro como manequim. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, n 213, p. 57-64, 2008.

CARMO, M. T.; ALMEIDA, M.T. 2006. **Bioteχνologias da Reprodução aplicadas na criação de equinos.** Disponível em: <[http://www.abqm.com.br/SecaoTecnica/bioteχνologias\\_reproducao.html](http://www.abqm.com.br/SecaoTecnica/bioteχνologias_reproducao.html)>. Acessado em: 14 de maio 2014.

CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação no sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossoma e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 186 f. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2005.

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

CBRA. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte, MG: p.45 (Manual), 2013.

CNA. **Estudo do complexo agronegócio do Cavalo**. 2006. Disponível em: <[http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalo\\_resumo.pdf](http://www.cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalo_resumo.pdf)>. Acesso em: 15 maio, 2014.

CNA. **Estudo do complexo agronegócio do cavalo**. 2010. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/65305362/ESTUDO-DO-COMPLEXO-DO-AGRONEGOCIO-CAVALO>>. Acesso em: Julho de 2014.

CHAPON, F. P. **Teste Hiposmótico**. 2011. (Monografia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária; Porto Alegre, 2011.

COSTA, D. N. M.; SILVA, D. A. M.; BOAKARI, W. L.; FERREIRA, S. B.; BRANCO, M. A. C. SOUZA, J. A. T. Eficiência dos Diluidores Tris e Botu-Crio® Sobre os Parâmetros Seminais de Garanhões das Raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador. **Ciência animal brasileira**, Goiânia, v.15, n.3, p. 322-329, jul./set. 2014.

COSTA, H. E.; FILHO, H. C.; FERREIRA, L. **Exterior e Treinamento do Cavalo**. Recife: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, p.169, 2001.

COSTA, N.; LOPES DO VALE, L. J.; LEITE, G. U. **Estudo da preservação do cavalo nordestino**. Recife: Departamento de Produção Animal, p. 36, 1974.

DOTT, H.M.; FOSTER, G.C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.29, p.443-445, 1972.

DELL'AQUA JR., J. A. **Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado equino.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Disponível em: <<http://www.athena.biblioteca.unesp.br>>. 81f. 2000.

ENCICLOPÉDIA, SD. **Cavalo Nordestino.** Disponível em: <<http://www.agrov.com/animais/equinos/nordestino.htm>>. Acesso em: 15 maio, 2014.

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.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process fertilization. **Biochimica e Biophysica Acta**, v.1469, p.197-235, 2000.

FLORES, E.; TABERNER, E.; RIVERA, M. M.; PENA, A.; RIGAU, T.; MIRO, J. RODRIGUEZ-GIL, J. E. Effects os freezing-thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. **Theriogenology**, v. 70, p. 936-945, 2008.

FURST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen equino.** 2006, 96 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

GARCIA, A.R. O uso de sondas fluorescentes na avaliação morfofuncional de espermatozoides bovinos. **Revista de Ciências Agrárias de Belém**, Suplemento, n.43, jun./jul. 2005.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L.A.; YUE, S. T.; ROTH, B. L.; HAUGLAND, R. P. Dual DNA Staining Assessment of Bovine Sperm Viability Using SYBR-14 and Propidium Iodide. **Journal of Andrology**, v. 15 (6), p. 620-629, 1994.

GUASTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; PAPA, F. O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozoides equinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.2, p.169-180, 2012.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7 ed., Barueri-SP: Manole, p. 530, 2004.

IBGE. **Banco de dados agregados**. 2010. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&c=73>>. Acesso em: 14 maio 2014.

KAVAK, A.; LUNDEHEIM, N.; AIDNIK, M.; EINARSSON, S. Sperm morphology in Estonian and Tori breed stallions. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.45, p. 11-18. 2004.

KARESKOSKI M, KATILA T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.249-56, 2008.

KER, P. G. **Fertilidade do sêmen congelado de jumento da Raça Pêga em éguas inseminadas antes e após a detecção da ovulação**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2010.

LAGARES, M. A.; MEIRELLES, L. S.; WALD, V. B.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Efeito de diferentes diluentes sobre a membrana plasmática do espermatozoide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 153-156, 2000.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of sperm plasma membrane: from polynsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Humam Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 246-256, 1996.

LIMA, R. A. S.; OLIVEIRA, R. A. MENDES, C. Q.; JÚNIOR, P. G. **Perfil e Tendências da Equideocultura Brasileira**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 49. A produção animal no mundo em transformação. Brasília, 23 a 26 de julho de 2012. **Anais... p. 15**.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. **Estudo do complexo do agronegócio do cavalo**: Relatório final CEPEA/ESALQ/USP, P. 251, 2006.

LINDEN, L. S. V. D. **A avaliação da integridade da membrana se baseia no fato de que a membrana plasmática íntegra pode prevenir a entrada do corante no citoplasma celular**. 2012. 61 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2012.

LOVE, C. C.; THOMPSON, J. A.; LOWRY, V. K.; VARNER, D. D. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, v. 57, p. 1135-1142. Feb, 2002.

LOOMIS, P.R.; GRAHAM, J.K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.119-28, 2008.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

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

MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, 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.

MELO; J. B. **Caracterização zoométrica do remanescente da raça equina Nordestina nos Estados de Pernambuco e Piauí**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, 118 p., 2011.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 4.ed. Porto Alegre: Sulina, 1987. 364 p.

NEILD, D. M.; CHAVES, M. G.; FLORES, M.; MIRAGAYA, M. H.; GONZALEZ, E.; AGUERO, A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrologia**, v.32, p.351-355, 2000.

OLIVEIRA, C. H. **Avaliação das características do espermatozóide equino congelado submetido à inclusão e remoção do colesterol das membranas**. 2007. 85f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.



OLIVEIRA, R. R. **Efeito *in vitro* da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoide de jumentos (*Equus asinus*) da raça pêga.** 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2010<sup>a</sup>.

OLIVEIRA, C. H; VASCONCELOS, F. A; SOUZA, A. O; MARTINS-FILHO, M. X; SILVA, F. C; VARAGO, M. A. et al. **Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm.** Anim Reprod Sci. v. 118, p. 194-200, 2010<sup>b</sup>.

OLIVEIRA, G. C. OLIVEIRA, B. M. M. CELEGHINI, E. C .C. FERNANDES, C. B. MATTOS, C. B. **Criopreservação do sêmen equino: uma revisão.** Rev. Bras. Reprod. Anim, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, jan./mar. 2013.

PENA, F. J.; SARAIVA, F.; JOHANNISSON, A.; WALGREN, M.; RODRIGUEZ-MARINEZ, H. A. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 28, p. 107-114, 2005.

PEREIRA, K. F.; GARCIA, A. R.; NAHÚM, B. S.; KAHWAGE, P. R. Uso de sondas de epifluorescência para a avaliação de sêmen criopreservado bubalino. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA, 16 e 17 de agosto. Embrapa Amazônia Oriental, Belém-PA, p. 1-4, 2012.

PUGLIESI, G. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5 °C por 24 horas com dois diluidores.** 2009. F. 103. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

PUGLIESI, G; FÜRST. R; CARVALHO, G. R. Efeito de diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação de sêmen de garanhões. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 172-177, 2012.

RATES, D. M. **Efeito da incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoide sobre o congelamento e fertilidade do sêmen de jumentos (*Equus asinus*) da raça pega.** 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2011.

RIBAS, J.A.S. **Influência das estações cheias e seca nas características reprodutivas e seminais de garanhões da raça pantaneira no pantanal de Poconé – MT. – UENFCCTA.** Campos dos Goytacazes, 2006 - Tese de Doutorado, 2006.

RICKER, J. V.; LINFOR, J. J.; DELFINO, W. J. **Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants.** *Biology of Reproduction*; v.74, p. 359-65, 2006.

ROBALO SILVA, JR.; AGRÍCOLA, R.; BARBOSA, M.; COSTA, L. L. **“Seasonal variation of testicular size, semen production and sexual behaviour of Lusitano stallions”**, *RPCV*, 102 (561-562)119-125, 2007.

SAMPER, J. C.; HANKINS, K. **Breeding mares with frozen semen in private practice.** In: *Proceeding of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners.* San Diego: AAEP. p. 314-8. 2001.

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária.** Ano 28. Jan-Fev, 2009.

SILVA, N. C.; LEÃO K. M.; MARQUES, T. C.; SILVA, R. P.; RODRIGUES, M. C. Uso de sêmen fresco e refrigerado em programas de Inseminação artificial em tempo fixo em fêmeas bovinas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 17; p. 2537, 2013.

SOBREIRA NETO, J. A. **Avaliação “in vitro” e in vivo” do sêmen equino diluído em água de coco em pó (ACP-105) e resfriado a 5°C.** 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Veterinária. Brasília/DF. 2008.

SOUZA LIMA, R. A; SHIROTA, R; CAMARGO BARROS, G. S. **Estudo do Complexo Agronegócio do Cavalo**. Centro de estudos de economia aplicada. ESALQ, USP, p. 12-19. 2006.

SQUIRES, E. L; PICKETT, B. W; GRAHAM D. K; VANDERWALL, P. M; BRUEMMER, J. E. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n 9, p. 3-36, 1999.

TERRACIANO, P. B. **Criopreservação de espermatozoide equino comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial**. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2008.

TORRES, A. P.; JARDIM, W. R. **Criação do cavalo e de outros equinos**. 3 ed. São Paulo: Nobel, 1992.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Manual de utilização do programa SAEG** (Sistema para Análise Estatística e Genéticas). Viçosa: UFV, p. 149, 1997.

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

VIDIGAL, K, F. **Integridade e funcionalidade da membrana plasmática, acrossomo e mitocôndrias espermáticas em caprinos segundo a conformação escrotal**. 2008. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Piauí, 2008.

## 9. ANEXO

### 9.1 Bull Media – TALP (Diluyente TALP)

Bull Talp	Quantidade em 100 mL
<u>Tyrodes</u>	
NaCl	0.569 g
KCl	0.023 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.004 g
NaHCO <sub>3</sub>	0.209 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025 g
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.008 g
<u>Talp</u>	
Na Pyruvate	0.0022 g
Na Lactate	0.368 mL
Glucose	0.090 g
HEPES	0.238 g
BSA	0.300 g

Adjust osmolality (300-310 mOsm) e pH (7,2-7.4)

### 9.2 Propidium Iodide (PI)

- Working solution at 1 mg/mL
- Stain 50 x 10<sup>6</sup> cells with 6 µl PI
- Staining is consistent in any sperm diluent
- Stain can be store in refrigerator

### 9.3 Solução Citrato – Sódio-Frutose

#### 9.3.1 Solução isosmótica com osmolaridade de 300 mOsm/L

Reagentes	Quantidade
Citrato trissódico	1,47 g
Frutose	2,7 g
Água (qsp)	100 mL