

AVALIAÇÃO DA CINÉTICA ESPERMÁTICA, INTEGRIDADE DE MEMBRANA PLASMÁTICA E RESISTÊNCIA AO ESTRESSE OXIDATIVO NO SÊMEN EQUINO CONGELADO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ESPERMÁTICAS

Bruno Ribeiro Avanzi¹
Renata Santos Ramos¹
Marcilio Nichi²
Eduardo Gorzoni Fioratti¹
José Antonio Dell'Aqua Jr³
Francisco Stefano Wechsler⁴
Frederico Ozanam Papa³

RESUMO

O processo de criopreservação do sêmen equino envolve vários procedimentos, incluindo a acomodação das células espermáticas em uma determinada concentração. No entanto, na literatura relata-se a utilização de valores compreendidos em uma ampla faixa de concentração por unidade de volume. Sendo assim, o presente experimento avaliou o efeito de diferentes concentrações espermáticas sobre algumas variáveis de qualidade seminal pós-descongelamento. Foram utilizados 04 ejaculados de 05 garanhões de diferentes raças ($n=20$), sendo cada ejaculado congelado em palhetas de 0,5 mL nas concentrações de 100, 200 e 400 x 10⁶ espermatozoides/mL. Avaliou-se as características do movimento espermático por exame computadorizado (CASA), integridade da membrana plasmática empregando as sondas fluorescentes iodeto de propídio e diacetato de carboxifluoresceína e susceptibilidade a peroxidação lipídica pela técnica de quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foi observado efeito significativo da concentração ($p<0,05$) para as variáveis de motilidade total, motilidade progressiva, velocidade ao longo de uma trajetória média, velocidade progressiva, velocidade curvilínea e espermatozoides rápidos, com superioridade para a criopreservação em concentrações mais baixas. Para as variáveis de deslocamento lateral de cabeça, retilinearidade, linearidade, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo não foram constatados efeitos significativos da concentração ($p>0,05$). Portanto, ao levar em consideração as variáveis de cinética espermática observou-se que a congelamento de sêmen equino empregando concentrações mais baixas pode tornar-se uma prática benéfica, porém testes de fertilidade devem ser realizados para avaliar a real superioridade deste procedimento e seu significado biológico, pois ao avaliar outras variáveis como integridade de membrana plasmática e susceptibilidade ao estresse oxidativo, não foram observados efeitos que justifiquem a adoção deste procedimento.

Palavras-chave: garanhão, sêmen, criopreservação, estresse oxidativo, concentração

¹ Aluno de Mestrado - FMVZ-UNESP-Botucatu - Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu.

* Correspondência: Bruno Ribeiro Avanzi, End.: Distrito de Rubião Jr. s/n, Cep: 18618-000, Botucatu, SP, avanzi_vet@yahoo.com.br, Fone-Fax:14-38116249

² Docente do Departamento de Reprodução Animal - FMVZ-USP-São Paulo.

³ Docente do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - FMVZ-UNESP-Botucatu.

⁴ Docente do Departamento de Produção Animal - FMVZ-UNESP-Botucatu.

ANALYSIS OF SPERM KINETICS, PLASMATIC MEMBRANE INTEGRITY AND RESISTENCE TO OXIDATIVE STRESS IN EQUINE FROZEN SEMEN WITH DIFFERENT SPERM CONCENTRATIONS

ABSTRACT

The cryopreservation process of equine semen involves many proceedings which includes the arrangement of sperm cells in a determinate concentration. However in the literature is related the use of values comprised in a large range of concentration per volume unity. Hence the present experiment evaluated the effect from different sperm concentrations about some variables of seminal quality after thaw. Four ejaculates of five stallions were collected, from breed various (n=20) and each ejaculate was frozen in straws of 0,5mL in concentrations of 100, 200 and 400x10⁶ spz/mL. It were evaluated the characteristics of sperm movement over the computer analysis (CASA), plasmatic membrane integrity that employs the fluorescent probes of propidium-iodide and carboxyfluorescein diacetate and susceptibility of lipid peroxidation by the technique from quantification thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). It was observed the significant effect of concentration (p<0,05) from the variables of total motility, progressive motility, velocity in the average trajectory, progressive velocity, curvilinear velocity and rapid spermatozoa, with superiority for cryopreservation in lower concentrations. For the variables of lateral amplitude of head, retilinearity, linearity, plasmatic membrane integrity and resistance for oxidative stress were not evidenced concentration significant effects (p>0,05). Therefore by token of the variables from sperm kinetics it was observed that the freezing of equine semen using lower concentrations should become a benefic practice, however it should be made fertility tests to evaluate the real superiority of this proceeding and the biologic meaning, because when others variables like plasmatic membrane integrity and susceptibility of oxidative stress were evaluated, it were not observed effects that justify the adoption of this proceeding.

Key-words: stallion, semen, cryopreservation, oxidative stress, concentration

EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA ESPERMÁTICA, INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y RESISTENCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL SEMEN EQUINO CONGELADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES ESPERMÁTICAS

RESUMEN

El proceso de criopreservación de el semen equino envuelve varios procedimientos, incluyendo la acomodación de las células espermáticas en una determinada concentración. Entretanto, la literatura ha relatado la utilización de valores en una amplia faja de concentración por unidad de volumen. Así, el presente trabajo analizó lo efecto de diferentes concentraciones espermáticas sobre algunas variables de calidad seminal posdescongelación. Fueron utilizados cuatro eyaculados de cinco caballos enteros de diferentes razas (n=20), siendo cada eyaculado congelado en pajuelas de 0,5mL en las concentraciones de 100, 200 y 400x10⁶ espermatozoides/ml. Las características del movimiento espermático fueron evaluadas a través de análisis computarizados (CASA), integridad de la membrana plasmática utilizando sondas fluorescentes de propídio y diacetato de carboxifluoresceína y susceptibilidad a la peroxidación lipídica por la técnica de cuantificación de substancia

reativa al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Fue observado efecto significativo de la concentración para las variables de motilidad total, motilidad progresiva, velocidad a lo largo de una trayectoria media, velocidad progresiva, velocidad curvilínea y espermatozoides rápidos, con superioridad para la criopreservación en concentraciones más bajas. Para las variables de dislocación lateral de cabeza, retilinealidad, linealidad, integridad de la membrana plasmática y resistencia al estrés oxidativo no fueron constatados efectos significativos de la concentración. Por lo tanto, a llevar en consideración las variables de cinética espermática fue observado que la congelación de semen equino empleando concentraciones más bajas puede ser una práctica benéfica, pero testes de fertilidad deben ser realizados para evaluar la real superioridad de este procedimiento y su significado biológico, pues al evaluar otras variables como integridad de la membrana plasmática y susceptibilidad al estrés oxidativo no fueron observados efectos que justifiquen la adopción de este procedimiento.

Palabras-clave: Caballo entero, Semen, Criopreservación, Estrés Oxidativo, Concentración.

INTRODUÇÃO

A biotecnologia de criopreservação do sêmen tem sido utilizada comercialmente há mais de meio século dentro da bovinocultura de leite, proporcionando grandes avanços neste segmento. Tal sucesso não tem sido observado na reprodução de eqüinos, provavelmente devido à ausência de seleção genética para características de fertilidade e resistência espermática à congelação em conjunto com fatores biofísicos e bioquímicos característicos dos espermatozoides da espécie equina (1-3).

Enquanto um número crescente de associações de raça aprova o uso de sêmen congelado, a aplicação desta técnica vem se difundindo em passos muito mais lentos do que o sêmen refrigerado (4).

Destacam-se entre as vantagens do uso do sêmen congelado a manutenção de éguas e potros em suas propriedades; ausência de fatores limitantes associados à logística para a distribuição do sêmen, como acontece com o sêmen refrigerado; possibilidade dos garanhões participarem de eventos durante a estação de coberturas; realização de inseminações mesmo em decorrência de doenças, lesões ou óbitos dos garanhões; compatibilidade com distribuição internacional; formação de um banco genético e disponibilidade deste por tempo indeterminado (1, 3-5).

Por outro lado, entre as desvantagens há deficiências no estabelecimento de padrões de qualidade e controle das doses de sêmen comercializadas, grande variabilidade na qualidade do sêmen pós-descongelação e taxas de prenhez inferiores quando comparadas à monta natural e inseminação com sêmen refrigerado para muitos garanhões (1, 3, 4, 6).

Os processos de congelação e descongelação provocam, entre outras alterações, desestabilização das membranas devido à reorganização e perda de lipídios conjuntamente com peroxidação lipídica em decorrência da ação de espécies reativas de oxigênio. Esses eventos podem afetar funções espermáticas como motilidade, resposta ao estresse osmótico e mecanismos de sinalização, comprometendo a habilidade dos espermatozoides de alcançarem, ligarem e reagirem com a zona pelúcida (7).

Atualmente, não há padronização de um protocolo para congelação de sêmen equino, tornando-se tendência a adoção de protocolos individuais para cada garanhão (3). Dentre variações nos procedimentos encontra-se o número de espermatozoides envasados por unidade de volume (20 a 1600 x 10⁶ de espermatozoides/mL). Porém, alguns estudos

avaliando o efeito da concentração espermática sobre a viabilidade celular pós-descongelamento, demonstraram resultados divergentes (6, 8-15).

A utilização de altas concentrações espermáticas para a congelamento pode ser prejudicial devido à limitação de canais que possam acomodar um número elevado de espermatozoides em tais amostras (16). Contudo, o emprego de altas concentrações espermáticas para o acondicionamento das amostras de sêmen congelado torna-se interessante por proporcionar a utilização de um número menor de palhetas por dose inseminante e facilitar o procedimento de inseminação artificial (15).

Por outro lado, biotecnologias emergentes como a sexagem espermática e inseminações com dose reduzida se beneficiariam de procedimentos que maximizassem o potencial fertilizante de amostras criopreservadas com um número reduzido de células espermáticas (14).

Dessa forma, o presente experimento avaliou o efeito de diferentes concentrações espermáticas sobre a qualidade do sêmen pós-descongelamento, incluindo características do movimento espermático, integridade da membrana plasmática e susceptibilidade ao estresse oxidativo sobre lipídios como métodos de avaliação.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 05 garanhões, de raças variadas (Árabe, Hannoverano, Mangalarga Marchador, Quarto de Milha e Westfallen), sob regime regular de colheita de sêmen, pertencentes ao Centro de Reprodução e Biotecnologia Equina – “CERBEQ”, vinculado ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Campus de Botucatu, SP.

Colheita dos ejaculados

As colheitas de sêmen foram realizadas em manequim com vagina artificial modelo “Botucatu” (Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil). Foram colhidos 04 ejaculados de cada garanhão (n=20).

Processamento e criopreservação das amostras

Após a colheita, o sêmen foi filtrado para remoção da fração gel e de sujidades, avaliando-se na fração livre de gel a concentração espermática, em câmara de Neubauer. Os parâmetros de cinética espermática foram avaliados em um analisador computadorizado dos movimentos espermáticos - CASA (HTM-IVOS 12; Hamilton-Thorne Research, Danvers, MA, USA) depositando uma alíquota de 10 µL de sêmen em uma câmara de Makler (Makler Counting Chamber[®], Sefi-Medical Instruments Ltd., Haifa, Israel) pré-aquecida a 37°C. Em cada amostra avaliou-se no mínimo 500 células e somente os ejaculados com motilidade total igual ou superior a 60% foram utilizados para criopreservação.

Para criopreservação dos ejaculados empregou-se a técnica descrita por Papa et al. (17), na qual cada ejaculado foi diluído em meio diluente à base de leite e glicose (Botu-Sêmen[®], Biotech Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil) em uma proporção de 1:1 (meio:sêmen) e centrifugado a 600xg por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os *pellets* ressuspendidos para as concentrações de 100x10⁶, 200x10⁶ e 400x10⁶ de espermatozoides totais/mL no meio diluente de congelamento Botu-Crio[®] (Biotech

Botucatu/ME Ltda., Botucatu, SP, Brasil). Após envase em palhetas de 0,5 ml e lacrá-las com álcool polivinílico, estas foram distribuídas em uma grade e resfriadas a 5°C por 20 minutos. Decorrido este período, a grade contendo as palhetas foi transferida para uma caixa de isopor de 40 litros e mantida por 20 minutos horizontalmente a uma distância de 6 cm da coluna de nitrogênio líquido (4 cm), sendo em seguida, imersa no nitrogênio.

Descongelamento das amostras e avaliações espermáticas

As palhetas foram descongeladas a 46°C por 20 segundos, de acordo com o proposto por Dell'Aqua Jr. et al. (18). Para análise de cinética espermática nas amostras de sêmen criopreservado empregou-se a avaliação computadorizada considerando as seguintes variáveis: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$) velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e espermatozoides rápidos (RAP, %).

Adicionalmente, foi realizada a análise de integridade da membrana plasmática (IMP, %) empregando-se a técnica de Harrison & Vickers (19) modificada por Zúccari (20) utilizando a associação das sondas fluorescentes diacetato de 6-carboxifluoresceína e iodeto de propídio e o teste de resistência das células espermáticas ao estresse oxidativo pelo método de quantificação do malondialdeído (TBARS, $\text{ng}/10^6\text{sptz}$), um subproduto da peroxidação lipídica (21).

Análise estatística

A análise estatística das variáveis estudadas no sêmen congelado/descongelado foi realizada mediante o programa SAS 9.1. Inicialmente, empregou-se o programa GLM para detectar heterocedasticidade por meio do teste de Brown-Forsythe. Em seguida, os dados foram analisados mediante o programa MIXED, o modelo estatístico incluiu o efeito fixo de concentração e os efeitos aleatórios de garanhões, colheitas dentro de garanhão e resíduos. Adotou-se uma estrutura de covariância auto-regressiva de primeira ordem para todas as variáveis, exceto MP, VSL e ALH, para as quais, em virtude da heterocedasticidade detectada, usou-se uma matriz não estruturada de covariâncias. Adotou-se um nível de probabilidade de 0,05 para diferenças estatisticamente significativas.

RESULTADOS

Foram observados efeitos significativos ($p < 0,05$) da concentração sobre as variáveis de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL) e espermatozoides rápidos (RAP), denotando superioridade para a criopreservação em concentrações mais baixas. Para a variável de motilidade total verificou-se um efeito logarítmico, sendo que para as demais variáveis nas quais tenham sido detectados efeitos significativos, estes demonstraram um efeito linear (Tabela 1 e Figuras 1-6). Para as demais variáveis (deslocamento lateral de cabeça, ALH; retilinearidade, STR; linearidade, LIM; integridade de membrana plasmática, IMP; resistência espermática ao estresse oxidativo, TBARS) não foi constatado efeito da concentração ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de quadrados mínimos com respectivos erros padrão e equações de regressão das variáveis analisadas pós-descongelamento nas amostras de sêmen equino criopreservadas em diferentes concentrações espermáticas (100×10^6 , 200×10^6 e 400×10^6 de espermatozoides totais/ml).

Variável	Concentração (10^6 spz/mL)			Equação de Regressão	p
	100	200	400		
MT (%)	74,5 (3,14)	71,6 (3,14)	70,6 (3,14)	$105,1+0,0195x-16,2774\log(x)$	0,0331
MP (%)	34,8 (2,58)	33,5 (2,79)	32,0 (2,88)	$35,6768-0,00841x$	0,0163
VAP ($\mu\text{m/s}$)	95,8 (2,56)	94,6 (2,56)	91,85 (2,56)	$97,15-0,01326x$	0,0021
VSL ($\mu\text{m/s}$)	74,8 (1,63)	74,0 (1,66)	71,8 (1,60)	$75,8531-0,01025x$	0,0002
VCL ($\mu\text{m/s}$)	176,4 (4,15)	173,6 (4,15)	167,4 (4,15)	$179,5-0,03038x$	0,0001
ALH (μm)	6,8 (0,10)	6,8 (0,10)	6,6 (0,10)	-	>0,05
BCF (Hz)	31,75 (0,87)	31,40 (0,87)	30,80 (0,87)	$32,05-0,00314x$	0,0473
STR (%)	77,7 (0,61)	77,8 (0,61)	77,7 (0,61)	-	>0,05
LIN (%)	43,4 (0,43)	43,5 (0,43)	43,6 (0,43)	-	>0,05
RAP (%)	59,5 (4,41)	56,4 (4,41)	54,3 (4,41)	$60,525-0,01514x$	0,0045
IMP (%)	41,6 (2,66)	40,1 (2,66)	39,4 (2,66)	-	>0,05
TBARS (ng/ 10^6 spz)	40,5 (2,57)	36,5 (2,57)	36,1 (2,57)	-	>0,05

MT: motilidade total, MP: motilidade progressiva, VAP: velocidade ao longo de uma trajetória média, VSL: velocidade progressiva, VCL: velocidade curvilínea, ALH: deslocamento lateral de cabeça, BCF: frequência de batimento flagelar, STR: retilinearidade, LIN: linearidade, RAP: espermatozoides rápidos, IMP: células com membrana plasmática íntegra, TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

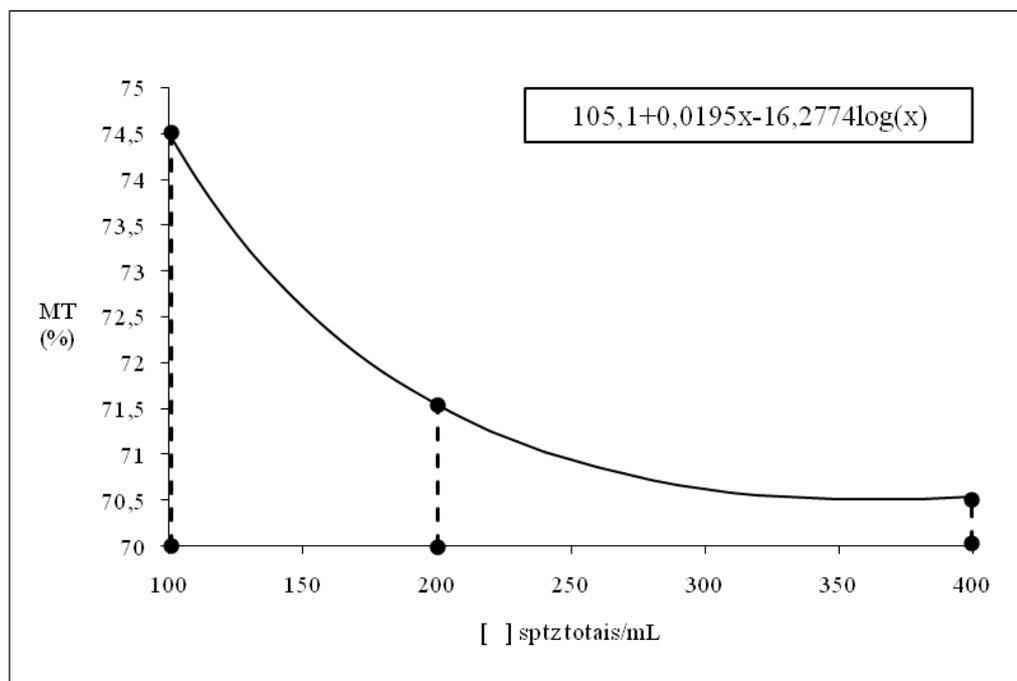


Figura 1. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito logarítmico da concentração na variável motilidade total (MT) no sêmen equino descongelado.

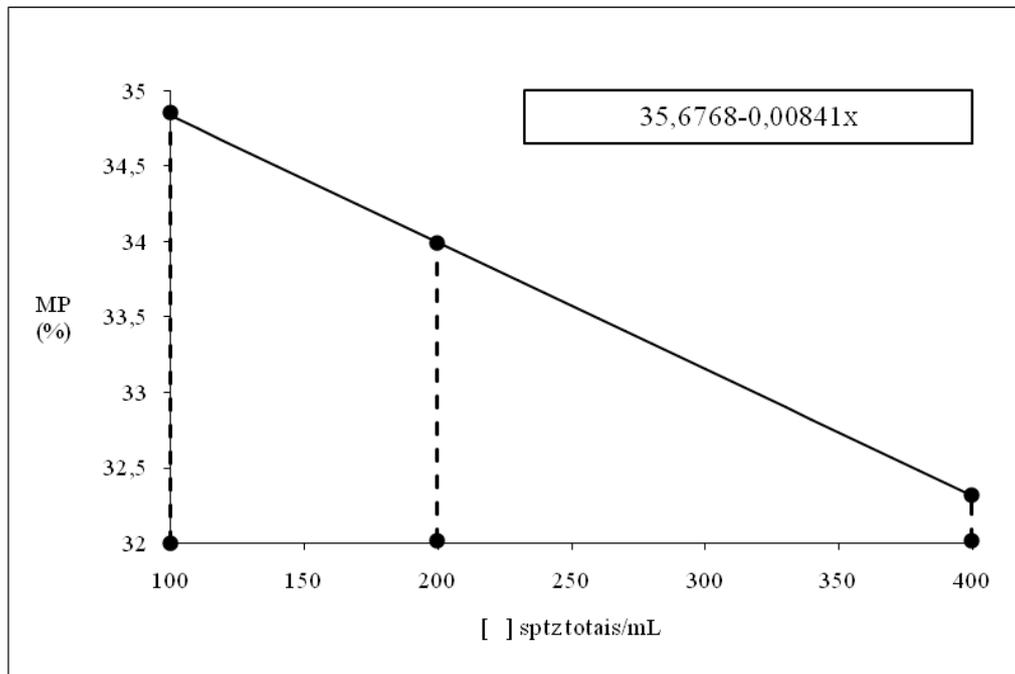


Figura 2. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável motilidade progressiva (MP) no sêmen equino descongelado.

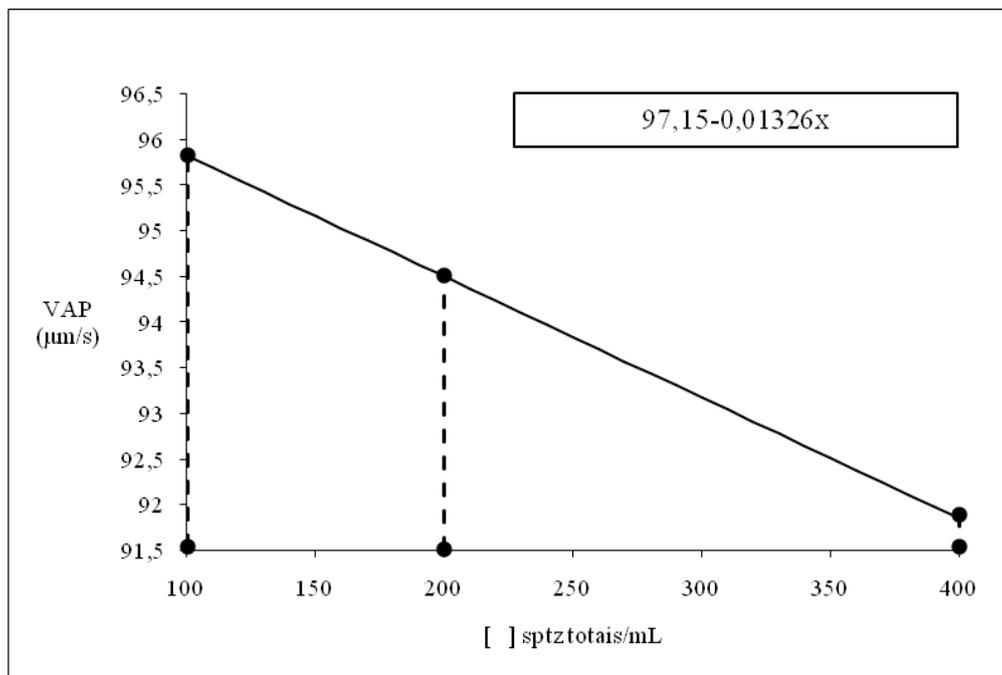


Figura 3. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável velocidade ao longo de uma trajetória média (VAP) no sêmen equino descongelado.

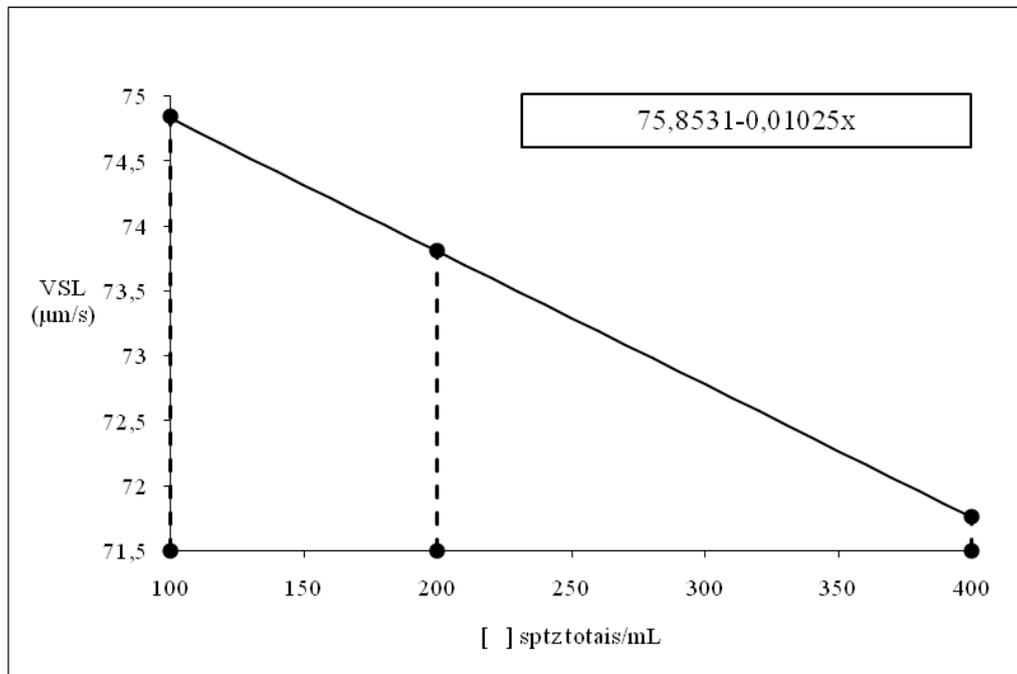


Figura 4. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável velocidade progressiva (VSL) no sêmen equino descongelado.

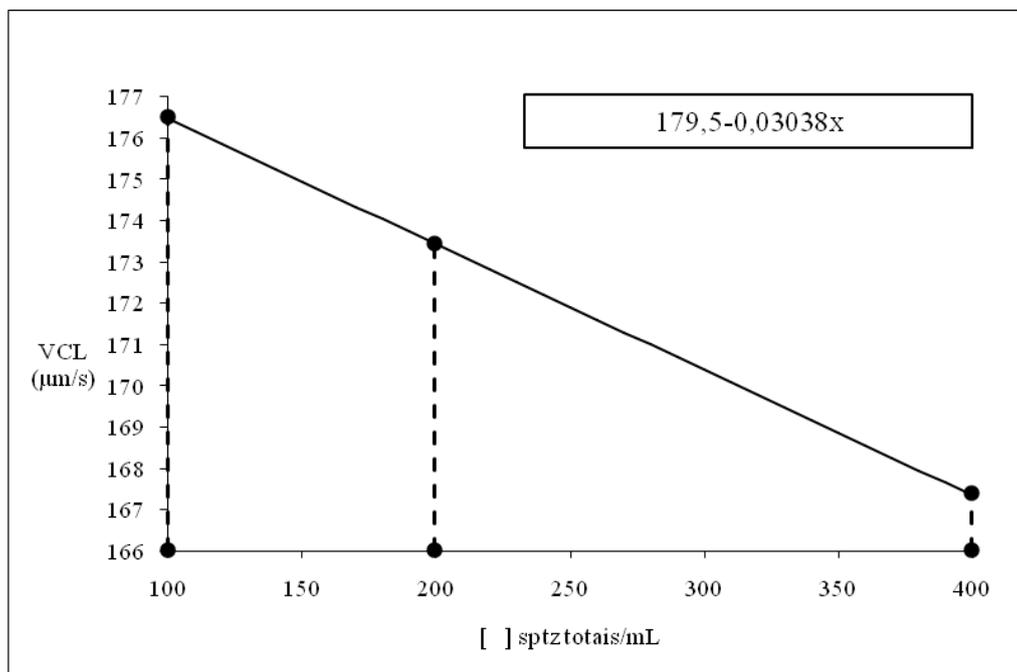


Figura 5. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável velocidade curvilínea (VCL) no sêmen equino descongelado.

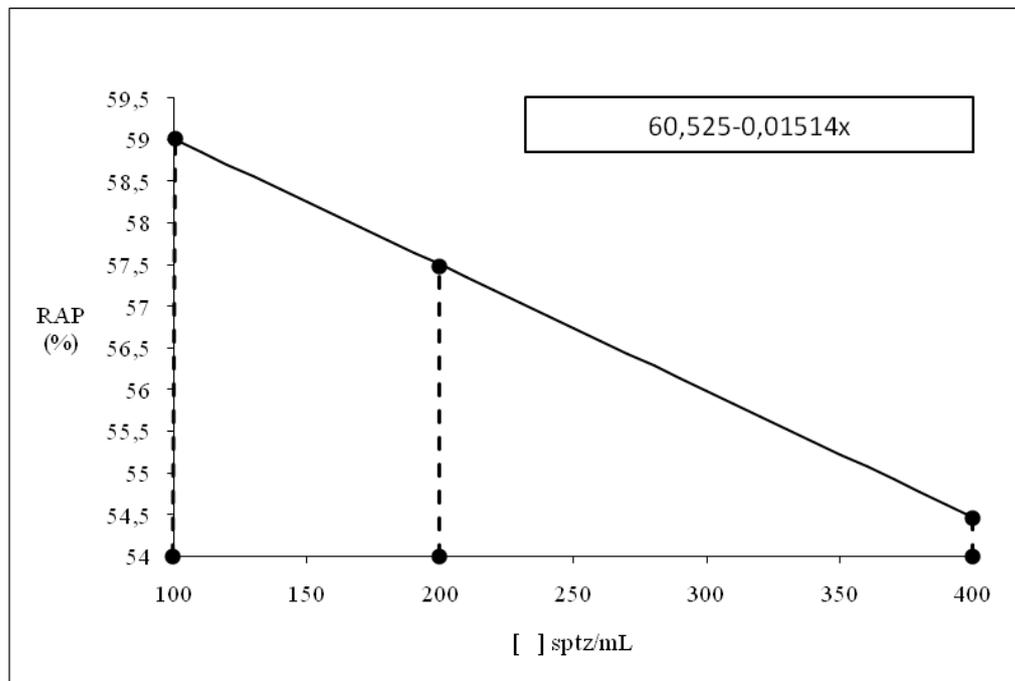


Figura 6. Curva da equação de regressão correspondente ao efeito linear da concentração na variável espermatozoides rápidos (RAP) no sêmen equino descongelado.

DISCUSSÃO

Neste experimento várias características de cinética espermática foram influenciadas pela concentração espermática, concordando com resultados relatados por outros autores.

Heitland et al. (12) analisaram o efeito de cinco concentrações (20, 200, 400, 800 e 1600×10^6 de espermatozoides/mL) sob variáveis de cinética espermática, empregando dois meios para criopreservação de sêmen equino. Obteve-se uma superioridade na motilidade total e progressiva para as concentrações entre 20 a 400×10^6 espermatozoides/mL.

Em 1998, Loomis & Clark (9) avaliaram o efeito do envase do sêmen nas concentrações de 200, 400 e 800×10^6 de espermatozoides/mL sobre os parâmetros de motilidade total e progressiva e verificaram que 200×10^6 de espermatozoides/mL foi superior às demais concentrações e 400×10^6 de espermatozoides/mL foi superior a 800×10^6 espermatozoides/mL.

Clulow et al. (14) demonstraram que amostras de sêmen equino criopreservadas a 40×10^6 de espermatozoides/mL foram superiores a 400×10^6 de espermatozoides/mL para as variáveis de motilidade total e progressiva.

Recentemente, no trabalho desenvolvido por Nascimento et al. (15) novamente verificou-se uma relação entre todas as variáveis de cinética espermática avaliadas (motilidade total, motilidade progressiva, velocidade progressiva, velocidade curvilínea e deslocamento lateral de cabeça) e concentração espermática para amostras de sêmen criopreservado. Observou-se que a concentração de 100×10^6 de espermatozoides/mL foi superior a 200 e 400×10^6 de espermatozoides/mL e que 200×10^6 de espermatozoides/mL foi superior a 400×10^6 de espermatozoides/mL.

No entanto, Papa et al. (8) não observaram diferenças nos índices de fertilidade entre éguas inseminadas com sêmen criopreservado em macrotubo de 4 mL na concentração de

100×10^6 de espermatozoides/mL e em sistemas de 2 mL (metade de macrotubo) na concentração de 200×10^6 de espermatozoides/mL.

Angola et al. (10) encontraram resultados de motilidade progressiva superiores ao empregar 800×10^6 de espermatozoides/mL em comparação a 100×10^6 de espermatozoides/mL. Porém, deve-se destacar que neste estudo a motilidade foi avaliada subjetivamente com microscopia de contraste de fase e os próprios autores levantaram a hipótese de erro de avaliação devido à quantidade distinta de células por campo entre os tratamentos.

Arruda et al. (11) não verificaram diferenças significativas sob a variável de motilidade progressiva ao testar as concentrações de 500 e 1000×10^6 de espermatozoides/mL em palhetas de 0,5 mL.

Já Leipold et al. (6) obtiveram taxas de prenhez sem diferença significativa entre amostras criopreservadas a 400 ou 1600×10^6 de espermatozoides/mL.

Adicionalmente, Blanes et al. (13) também não observaram efeito significativo da concentração (100, 200, 300 e 400×10^6 de espermatozoides/mL) sob características de cinética espermática.

A avaliação da integridade da membrana plasmática é um importante parâmetro de qualidade seminal (22). Porém, os resultados deste estudo, não demonstraram efeito da concentração sobre a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra, conforme demonstrado por Blanes et al. (13). Por outro lado, Nascimento et al. (15) verificaram também um efeito da concentração sobre a integridade da membrana plasmática.

Acredita-se que divergência de resultados entre os experimentos ocorram em função de variações nos procedimentos adotados para o processamento, criopreservação, descongelamento ou avaliação do sêmen, pois como abordado anteriormente, cada laboratório adota uma técnica de eleição. Adicionalmente, há evidências de que o efeito da concentração possui um grau de relação com características individuais dos animais utilizados (15, 23).

Outro fator a ser considerado é meio o diluente, não apenas pela constituição química e consequente interação entre as substâncias e os espermatozoides, como também pelas características físicas que podem influenciar a organização dos cristais de gelo e canais de solução que abrigam os espermatozoides (24). Corrobora com esta hipótese o estudo desenvolvido por Heitland et al. (12), demonstrando haver uma interação entre concentração e meio diluente, pois os resultados relativos ao efeito da concentração variaram em função do meio utilizado.

Um dos objetivos deste experimento foi verificar se maiores concentrações de células poderiam acarretar em menor resistência ao estresse oxidativo devido ao aumento proporcional de células anormais, pois sabe-se que a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) é maior na presença de células danificadas pela congelação, não-viáveis ou morfológicamente anormais (25). Porém, não verificou-se efeito da concentração sobre a resistência das células espermáticas ao estresse oxidativo. Este fato pode estar relacionado ao intervalo de concentração estudado, o qual pode ter sido insuficiente para evidenciar alguma diferença ou a capacidade antioxidante do meio de congelação utilizado pode ter mascarado o possível efeito deletério de concentrações mais elevadas (26).

O mecanismo por trás da alteração na qualidade seminal decorrente da concentração não é bem esclarecido, mas acredita-se que a quantidade de nutrientes e crioprotetor por célula espermática e fatores físicos como velocidade de congelação das células, formação de cristais de gelo e efeito osmótico possam estar envolvidos (15, 23, 27).

CONCLUSÃO

Conclui-se que há uma relação entre concentração e diversas características de cinética espermática no sêmen equino congelado, na qual a utilização de concentrações mais baixas proporcionam um efeito benéfico na qualidade seminal pós-descongelamento. Acredita-se que isto possa favorecer os protocolos de criopreservação, além de trazer boas perspectivas para a criopreservação de sêmen sexado e técnicas de inseminação com baixas doses.

REFERÊNCIAS

1. Samper JC, Hankins K. Breeding mares with frozen semen in private practice. In: Proceeding of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners; 2001, San Diego. San Diego: AAEP; 2001. p. 314-8.
2. Varner DD. Approaches to cryopreservation of equine semen. Current techniques for semen cryopreservation and new investigative strategies that may improve performance of cryopreserved semen from a higher percentage of stallions. In: Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians; 2003, Pisa. Pisa: SIVE; 2003. p.9.
3. Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Anim Reprod Sci.* 2008;105:119-28.
4. Loomis PR. The equine frozen semen industry. *Anim Reprod Sci.* 2001;68:191-200.
5. Loomis PR, Squires EL. Frozen semen management in equine breeding programs. *Theriogenology.* 2005;64:480-91.
6. Leipold SD, Graham JK, Squires EL, Mccue PM, Brinsko SP, Vanderwall DK. Effect of spermatozoa concentration and number on fertility of frozen equine semen. *Theriogenology.* 1998;49:1537-43.
7. Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F, et al. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol Reprod.* 2006;74:359-65.
8. Papa FO, Prestes NC, Alvarenga MA, Bicudo SD, Branco MDL. Influência de diferentes volumes sobre os parâmetros espermáticos e sobre os índices de fertilidade de sêmen congelado de equino. *Rev Bras Reprod Anim.* 1989;1:223.
9. Loomis PR, Clark JS. Motion characteristics of frozen-thawed equine spermatozoa paced in 0.5 mL straws at various concentrations. In: Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology; 1998, Baltimore. Baltimore: Society for Theriogenology; 1998. p.142.
10. Angola AP, Méndez JV, Quintero LZ. Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y La motilidad posdescongelación del semen de equino. *Vet Mex.* 1992;23:315-8.

11. Arruda RP, Barnabe VH, Taveira RT, Vieira RC, Visintin JA. Duas técnicas para o congelamento do sêmen de eqüinos acondicionado em palhetas de 0,50 mL. In: Anais do 10º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal; 1993, Belo Horizonte. Belo Horizonte: CBRA; 1993. p.327.
12. Heitland AV, Jasko DJ, Squires EL, Graham JK, Pickett BW, Hamilton C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Equine Vet J.* 1996;28:47-53.
13. Blanes MS, Papa FO, Dores CB, Melo CM, Crocci AJ. Influência do número de espermatozóides e tempo de estabilização na congelação de sêmen eqüino utilizando-se o diluente Botu-Crio. *Acta Sci Vet.* 2005;33:303.
14. Clulow JR, Mansfield LJ, Morris LHA, Evans G, Maxwell WMC. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2008;108:298-308.
15. Nascimento J, Raphael CF, Andrade AFC, Alonso MA, Celeghini ECC, Arruda RP. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *J Equine Vet Sci.* 2008;28:351-8.
16. Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 1996;12:131-47.
17. Papa FO, Zahn FS, Dell'Aqua Jr. JA, Alvarenga MA. Utilização do diluente MP50 para criopreservação de sêmen eqüino. *Rev Bras Reprod Anim.* 2002;26:184-7.
18. Dell'Aqua Jr. JA, Papa FO, Zahn FS. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci.* 2002;68:344-6.
19. Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1990;88:343-52.
20. Zúccari CESN. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 1998.
21. Nichi M, Goovaerts IGF, Cortada CNM, Barnabe VH, De Clercq JBP, Bols PEJ. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 °C. *Theriogenology.* 2007;67:334-40.
22. Varner DD. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology.* 2008;70:448-62.
23. Ballester J, Johannisson A, Saravia F, Haard M, Gustafsson H, Bajramovic D, et al. Post-thaw viability of bull AI-doses with low-sperm numbers. *Theriogenology.* 2007;68:934-43.

24. Amirat L, Anton M, Tainturier D, Chatagnon G, Battut I, Courtens JL. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*. 2005;129:535-43.
25. Ball BA, Vo AT, Baumber J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am J Vet Res*. 2001;62:508-15.
26. Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology*. 2005;63:1354-65.
27. Samper JC, Morris CA. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*. 1998;49:895-903.

Recebido em: 10/02/10

Aceito em: 26/11/10