



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA**

**Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas
características funcionais dos espermatozóides eqüinos
criopreservados**

CARLOS EDUARDO GOMEZ MARTIN

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. João Carlos Deschamps como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Área de Concentração: Reprodução Animal, para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Abril 2005



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA**

**Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas
características funcionais dos espermatozóides eqüinos
criopreservados**

CARLOS EDUARDO GOMEZ MARTIN

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. João Carlos Deschamps como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Área de Concentração: Reprodução Animal, para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Abril 2005

CARLOS EDUARDO GOMEZ MARTIN

**Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas
características funcionais dos espermatozóides eqüinos
criopreservados**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pelotas, sob a orientação do Prof. João Carlos Deschamps como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Medicina Veterinária, Área de Concentração: Reprodução Animal, para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

APROVADA:

Prof. Denise Calisto Bongalhardo

Prof. Thomaz Lucia Junior

Prof. Sandra Mara da Encarnação Fiala

**Prof. João Carlos Deschamps
(Orientador)**

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE TABELAS	VI
SUMÁRIO	VII
SUMMARY	IX
1.INTRODUÇÃO GERAL	01
2.TRABALHO: EFEITO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE SOBRE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DOS ESPEREMATOZÓIDES EQUINOS SUBMETIDOS A CRIOPRESERVAÇÃO.....	04
RESUMO	04
1.INTRODUÇÃO	05
2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	07
2.1. Local	07
2.2. Animais.....	07
2.3. Avaliação seminal para seleção e pré congelação	08
2.4. Coleta e preparação do sêmen para congelação	08
2.5. Processamento sêmen	09
2.6. Descongelamento e avaliação	10
2.7. Análise estatística	11
3.RESULTADOS.....	11
4 DISCUSSÃO.....	12
5 BIBLIOGRAFIA	15

AGRADECIMENTOS

DEUS, pela vida;

FAMÍLIA, Sinara e Pedro pela paciência e carinho;

COLEGAS, pela ajuda e apoio durante a execução desta dissertação;

ORIENTADOR, Deschamps um facilitador, determinado e muito mais que um amigo;

FINANCIADORES, permitiram materialmente a execução deste trabalho;

HARAS, por disponibilizarem os animais;

ESPECIAL, aos amigos e colegas Carlos Eduardo Wayne Nogueira, Bruna da Rosa Curcio, Friedrich Frey Jr, Carlos Horacio Bastos Borges e Ulisses Lignon Carneiro;

MUITO OBRIGADO!

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1: Composição do diluente G-EDTA para centrifugação do sêmen EXP1.....	09
TABELA 2: Composição dos diluentes utilizados no EXP1	09
TABELA 3: Parâmetros da motilidade do sêmen eqüino criopreservado com diluente modificado de Martin <i>et al.</i> [3] e avaliados pelo sistema CASA..	10
TABELA 4:Valores médios da motilidade total e velocidades de trajeto, curvilinear e progressiva, dos espermatozóides eqüinos criopreservados.....	12
TABELA 5:Valores médios da motilidade total MT% e média do choque hiposmótico CHIPO%.....	12

SUMÁRIO

MARTIN, CARLOS EDUARDO GOMEZ, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2005. **Efeito da lipoproteína de baixa densidade sobre algumas características funcionais dos espermatozóides eqüinos criopreservados.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias – Reprodução Animal). Faculdade de Veterinária. Orientador: Deschamps, João Carlos.

A gema do ovo é uma das principais substâncias usadas na composição dos diluentes de criopreservação do sêmen de eqüinos. Entretanto, a gema de ovo possui na sua composição substâncias indesejáveis, as quais podem interferir no processo de criopreservação. O efeito benéfico da gema de ovo é atribuído, principalmente, à lipoproteína de baixa densidade (LDL). Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da substituição da gema de ovo integral do um diluente modificado de Martin *et al.* (1979), pela LDL em diferentes concentrações, sobre a Motilidade Total (MT), Velocidade de Trajeto (VAP μ /ms), Velocidade Curvilinear (VCL μ /ms), Velocidade Progressiva (VSL μ /ms) e o Choque Hiposmótico (CHIPO%). No experimento 1 (EXP1) foi utilizado o diluente modificado de Martin *et al.* (1979) gema 20% como controle (T0), e LDL purificada nas concentrações de 8% (T1), 10% (T2) e 12% (T3). Sêmen de cinco garanhões da raça Puro Sangue Inglês foi utilizado, cujos ejaculados possuíam motilidade $\geq 70\%$, vigor ≥ 3 e patologias $\leq 30\%$, além de fertilidade conhecida. O sêmen foi colhido com o auxílio da vagina artificial modelo Hannover e, imediatamente, separado da porção de gel. O volume foi mensurado e o sêmen centrifugado a $800 \times g/5\text{min}$ com o diluente G-EDTA, eliminando o plasma seminal. O pellet formado foi dividido em 4 porções iguais e adicionado aos 4 tratamentos (T0), (T1), (T2), (T3). A concentração de células espermáticas foi ajustada para 200×10^6 espermatozóides/ml. Para o acondicionamento do sêmen foram usadas palhetas francesas de 0,5ml. As palhetas foram colocadas em uma máquina de congelamento (TK 3000®), e a curva seguiu um padrão de resfriamento até 5°C e, posteriormente, até -120°C , onde foram colocadas diretamente no nitrogênio líquido. No experimento 2 (EXP2) foi utilizado sêmen de 3 garanhões da raça Crioula, utilizando os procedimentos do EXP1, entretanto, a centrifugação do sêmen foi realizada sem a adição no diluente G-EDTA e a concentração espermática foi de 50×10^6 espermatozóides/ml. No EXP2 foi utilizado o diluente modificado de Martin *et al.* (1979) (T0), e a LDL purificada na concentração de 8% no lugar da gema de ovo (T1). O descongelamento do sêmen foi realizado em banho-maria a $37^\circ\text{C} / 30\text{s}$ nos EXP1 e EXP2. No EXP1, as amostras foram submetidas à análise computadorizada (Computer-Assisted Semen Analysis - CASA), onde foram observadas a Motilidade Total (MT), Velocidade de Trajeto (VAP μ /ms), Velocidade Curvilinear (VCL μ /ms) e Velocidade Progressiva (VSL μ /ms). No EXP2 foram avaliadas a (MT) e o teste para avaliação da integridade de membrana, choque hiposmótico, (CHIPO). As variáveis respostas foram analisadas através do programa Statitix®, utilizando a análise da variância com medidas repetidas e comparação de médias pela diferença mínima significativa (LSD). No EXP1, as MT médias nos tratamentos T0 (23,3%), T1 (18,0%), T2 (15,1%) e T3 (16,9%), não diferiram ($P>0,05$). A VAP nos tratamentos T0 (86,0 μ /ms) e T1 (81,5 μ /ms) não diferiu ($P>0,05$). O T0 foi superior ($P<0,05$) aos tratamentos T2 (77,2 μ /ms) e T3 (77,9 μ /ms), entretanto, o T1, T2 e T3 foram iguais ($P>0,05$). A VCL nos

tratamentos T0 (158,2 μ /ms) e T1 (147,3 μ /ms) não diferiu ($P>0,05$), entretanto, o T0 foi superior ($P<0,05$) aos tratamentos T2 (138,2/ μ ms) e T3 (141,8/ μ ms). A VSL nos tratamentos T0 (61,3 μ 3/ms), T1 (60,6 μ /ms), T2 (58,1 μ /ms) e T3 (57,8 μ /ms), não foi diferente ($P>0,05$). No EXP2, MT média nos tratamentos T0 (35,5%) e T1 (48,8%) diferiu ($P<0,05$) sendo T1 superior a T0. O CHIPO nos tratamentos T0 (30,1%) e T1 (27,8%) não diferiu ($P>0,05$) sendo T0 igual a T1. Dessa forma, concluímos que a LDL na concentração de 8%, pode substituir a gema de ovo na composição do diluente modificado de Martin *et al.*(1979) utilizado para criopreservar sêmen eqüino.

SUMMARY

MARTIN, CARLOS EDUARDO GOMEZ, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2004. **Effect of low-density lipoprotein on some functional characteristics of cryopreserved equine spermatozoa.** Advisor: Deschamps, João Carlos.

Egg yolk is one the main substances used in extenders for cryopreservation of equine semen. Its function is to reduce the cold shock caused by temperature variation during the freezing-thawing process. However, egg yolk contains substances that can have negative effects on cryopreservation and can also carry potentially pathogenic substances. Benefits derived from the use of egg yolk are mainly attributed to the presence of low-density lipoproteins (LDL). LDL act either by incorporating their content of phospholipids and cholesterol to the spermatozoa plasma membrane or by their association with seminal plasma proteins, which prevents such proteins to phospholipids and cholesterol from the spermatozoa plasma membrane. Thus, LDL make spermatozoa plasma membrane more stable, reducing their sensitivity to cold shock. This study aimed to investigate the effects of the replacement of the egg yolk in a commercial extender by different concentrations of LDL on some functional characteristics of cryopreserved equine spermatozoa. In experiment 1 (EXP1), the control treatment was the Martin et al. (1979) extender (T0) whereas the LDL treatments had concentrations of 8% (T1), 10% (T2) and 12% (T3). We used semen from five thoroughbred stallions with known fertility presenting at least 70% of sperm motility, sperm vigor of 3 and at most 30% of morphological sperm abnormalities. Semen was collected with a Hannover artificial vagina and immediately separated from its gel portion. After measurement of the volume, the semen was centrifugated at 800 g during 5 m with G-DETA extender to eliminate seminal plasma. The pellet was divided in 4 fractions, one for each treatment (T0), (T1), (T2), and (T3). Sperm cells concentration was adjusted to 200×10^6 per ml and place in to 0,5 ml straws. Straws were put in a TK 3000® freezing machine, with cooling at 5°C , followed by reduction to -120°C . After wards, straws were immersed in liquid Nitrogen. In Experiment 2 (EXP2), we used semen from 3 Crioulo bred stallions, and the same procedures used in EXP1, although semen centrifugation was done without G-EDTA and sperm concentration was adjusted to 50×10^6 spermatozoa/ml. In EXP 2, (T0) used the Martin et al. extender in the control group (T0) compared against its replacement by 8% LDL (T1). In both EXP1 and EXP2, thawing was done in water-bath at 37°C during 30 s. In EXP1, semen samples were submitted to analysis through the Computer-Assisted Semen Analysis (CASA), with evaluation of: total Motility (MT); speed of trajectory in μ/ms (VAP); curvilinear speed in μ/ms (VCL); and progressive speed in μ/ms (VSL). In EXP2, the characteristics evaluated were MT and response to hypoosmotic swelling test (CHIPO). The dependent variables were submitted to repeated measures analysis of variance, with comparisons of means by LSD test. In EXP1, mean MT% did not differ ($P > 0,05$). among treatments: T0 (23,3%); T1 (18,0%); T2 (15,1%); and T3 (16,9%). VAP for T0 (86,0 μ/ms) was higher ($P < 0,05$) than for T2 and T3 (77,2 and 77,9 μ/ms , respectively), but did not differ ($P > 0,05$) from T1 (81,5 μ/ms). However, VAP was similar for T1, T2 and T3 ($P > 0,05$). VCL did not differ ($P > 0,05$), for T0 (158,2 μ/ms) and T1 (147,3 μ/ms), but it was higher ($P < 0,05$) for T0 than for T2 (138,2 μ/ms) and T3 (141,8 μ/ms). VSL did not differ ($P > 0,05$) across treatments: T0 (61,3 μ/ms); T1 (60,6 μ/ms); T2 (58,1 μ/ms); and T3 (57,8 μ/ms). In EXP2, MT in T1 (48,8%)

was higher ($P < 0,05$) than in T0 (35,5%), although no differences ($P > 0,05$) were observed in the response to CHIPO: T0 (30,1%); and T1 (27,8%). Therefore, LDL at 8% can replace egg yolk in the composition of the Martin et al.(1979) extender for cryopreservation of equine semen, without detrimental effects for semen quality.

INTRODUÇÃO GERAL

As biotécnicas reprodutivas têm sido utilizadas na espécie eqüina, embora ainda sejam restritas a algumas associações de raça, tais como a “American Quarter Horse Association” e a “American Paint Horse Association”. No Brasil a Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Quarto de Milha, Apaloosa, Paint Horse, Mangalarga Marchador e com algumas restrições da raça Crioula permitem, o uso de algumas biotécnicas. Segundo Long [1], a indústria do cavalo ainda apresenta um grande desafio para a aplicação das técnicas de reprodução assistida. Entre essas técnicas, a mais comum é a inseminação artificial (IA). O sucesso da conservação do sêmen na inseminação artificial passou a ser importante para a criação de cavalos [4]. Vários protocolos foram descritos para a manipulação do sêmen, dentre eles o de criopreservação publicado por Nishikawa [2] e Martin *et al.* [3]. Em uma revisão publicada por Loomis [5], sobre a indústria do sêmen congelado eqüino, as seguintes vantagens são relacionadas; (a) o garanhão não precisa estar presente no momento da IA da égua, podendo estar disponível para outras atividades; (b) doenças, lesões ou a morte do garanhão não impedem que as éguas sejam inseminadas; (c) o sêmen pode ser transportado com antecedência e mantido no haras até o momento ótimo da IA; (d) há possibilidade de comercialização internacional; (e) o processamento do sêmen congelado por laboratórios especializados pode reduzir a variabilidade da qualidade quando comparado com o sêmen refrigerado; (f) menos sêmen é desperdiçado, pois todo sêmen coletado é processado e armazenado, resultando entre 10 e 12 doses por ejaculado. Já com o sêmen refrigerado o sêmen é coletado e transportado para IA de uma ou duas éguas e o restante do sêmen é descartado. Entretanto, o mesmo autor cita algumas desvantagens da utilização do sêmen congelado, entre elas: (a) a menor fertilidade em alguns garanhões quando comparada com o sêmen refrigerado; (b) mais especialização é necessária para processar o sêmen quando comparado com o sêmen refrigerado; (c) o custo do transporte do botijão com sêmen congelado é superior ao container com sêmen refrigerado; (d) se o sêmen congelado é comercializado com um número limitado de doses inseminantes por ciclo, o custo de manejo da égua é superior ao sêmen refrigerado, necessitando exames mais freqüentes, pois o sêmen tem menor longevidade na égua. Portanto, há necessidade de

aproximar o momento da IA com o da ovulação; (e) a seleção das éguas deve ser mais restrita quando IA com sêmen congelado.

A taxa de prenhes média por ciclo, em éguas IA com sêmen congelado, situa-se entre 30 e 40%, com uma grande variação entre garanhões [6]. Já Loomis [5] obteve uma taxa de prenhes no primeiro ciclo da estação reprodutiva, utilizando sêmen de equino congelado entre 51,3% e 75,6%, respectivamente, sendo que dados obtidos na estação reprodutiva foram comparáveis aos obtidos com sêmen refrigerado.

A congelabilidade do sêmen, definida como o número de ejaculados selecionados / número total de ejaculados, de 161 diferentes garanhões analisados por Vidament *et al.* [7], mostrou que 19, 10 e (27 a 24) % tiveram congelabilidade, entre 0 e 33%, 33 e 66% e mais de 66%, respectivamente. No processo de criopreservação, a interação entre espermatozóide e o meio que está a seu redor, é um dos fatores cruciais que afeta a preservação, a integridade e a habilidade de fertilização [8]. Além de outros fatores como, meio adequado com características físico-químicas ideais, uma curva de congelamento adequada e a descongelação compatível com o processo de congelamento, que combinados, otimizam o processo de criopreservação. Os diluentes utilizados para preservação dos espermatozoides durante o processo de congelamento, contêm em sua fórmula água, como um solvente para o sêmen e os componentes do diluente, monossacarídeos, como substratos energéticos, substâncias iônicas e não-iônicas que atuam como tampões e reguladores da osmolaridade, compostos orgânicos: gema de ovo, leite desnatado e o glicerol, os quais são classificados como crioprotetores não-penetrantes e penetrantes respectivamente. Portanto, as substâncias que compõem a fórmula dos diluentes, são fundamentais para que a técnica tenha êxito.

A gema de ovo, crioprotetor não-penetrante, é uma das substâncias freqüentemente utilizada nos diluentes para a criopreservação dos espermatozoides dos mamíferos, visando a proteção das células durante o processo de congelamento e descongelamento, evitando assim, o choque térmico [9]. As desvantagens desses diluentes que usam a gema de ovo integral são atribuídas à opacidade óptica, causada pelos grânulos formados, que dificultam o exame imediato à avaliação microscópica, o prejuízo causado à respiração do espermatozóide [10], a diminuição da motilidade [11] e, ainda, podem transportar microorganismos patogênicos [12]. A sobrevivência dos espermatozoides após o processo

de criopreservação requer a solução de uma equação multifatorial envolvendo variáveis como a integridade de cada compartimento celular, membrana plasmática, acrossomo, mitocôndria, citoesqueleto, núcleo e glicocálice [13].

Evidências indicam, segundo caracterização bioquímica feita por Banaszak *et al.* [14] e Kuksis [15], que a ação protetora dos diluentes que usam a gema de ovo é atribuída à fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL) [8]. A LDL é composta por 12% de proteínas, 87% lipídios e apresenta um formato esférico medindo aproximadamente 35µm. A LDL é extremamente solúvel em meios à base de água, devido a sua baixa densidade, e não precipita após algumas horas, promovendo um filme interfacial entre os ácidos graxos e a água [16].

Bergerom *et al* [17] comprovaram que a LDL promove a incorporação de fosfolipídios e colesterol a membrana e, também, previne a saída de fosfolipídio e colesterol da membrana espermática, através da formação de um complexo com as proteínas do plasma seminal [8,17]. Dessa forma, impede-se que as proteínas do plasma seminal fiquem disponíveis para atuarem na membrana espermática, evitando assim o efluxo de fosfolipídios [18,17] e colesterol [17], conferindo à célula espermática maior resistência ao choque térmico.

A ação crioprotetora da LDL, similar a da gema de ovo, quando utilizada nos diluentes de criopreservação, tem sido comprovada na espécie eqüina [19], bovina [9,20], suína [21], canina [22], peixes [23] e em outras espécies [24].

As evidências descritas nos trabalhos citados sugerem que a LDL pode substituir a gema de ovo integral na formulação dos diluentes utilizados na criopreservação do espermatozóide eqüino. Os experimentos realizados no presente trabalho, visaram determinar os efeitos da substituição da gema de ovo integral, pela LDL purificada em diferentes concentrações sobre: Motilidade Total (MT), Velocidade de Trajeto (VAPµ/ms), Velocidade Curvilínea (VCLµ/ms), Velocidade Progressiva (VSLµ/ms) e o Choque Hiposmótico (CHIPO%).

EFEITO DA LIPOPROTEÍNA DE BAIXA DENSIDADE SOBRE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS DOS ESPERMATOZÓIDES EQÜINOS SUBMETIDOS A CRIOPRESERVAÇÃO

Carlos Eduardo Gomez Martin¹, João Carlos Deschamps¹, Thomaz Lucia Jr¹, Carlos Eduardo Wayne Nogueira², Bruna da Rosa Curcio¹, Friedrich Frey Jr², Cinthia Truram Mendonça³, Ramiro Madruga Costa³.

¹ Laboratório de Reprodução Animal, Centro de biotecnologia, Faculdade de Veterinária

² Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária

Campus Universitário s/n – Caixa Postal 354 – CEP 96010-900

Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS.

³ Fazenda Sta. Angélica

Herval - Rio Grande do Sul

Resumo

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da substituição da gema de ovo integral em um diluente utilizado em larga escala, pela LDL em diferentes concentrações, sobre algumas características funcionais dos espermatozóides eqüinos criopreservados. No experimento 1 (EXP1) foi utilizado o diluente modificado de Martin *et al.* (1979) T0, e a substituição da gema de ovo integral no T0 pela LDL purificada nas concentrações de 8% T1, 10% T2 e 12% T3. Sêmen de cinco garanhões da raça Puro Sangue Inglês foram utilizados, cujos ejaculados possuíam motilidade $\geq 70\%$, vigor ≥ 3 e patologias $\leq 30\%$, além da fertilidade conhecida. O sêmen foi colhido com o auxílio da vagina artificial modelo Hannover separado da porção de gel, o volume foi mensurado, e centrifugado a 800 x g/5min com o diluente G-EDTA, eliminando o plasma seminal. O pellet formado foi dividido em 4 porções iguais e adicionado os 4 tratamentos (T0, T1, T2, T3). A concentração de células espermáticas foi ajustada para 200×10^6 espermatozóides/ml. Para o acondicionamento do sêmen foram usadas palhetas francesas de 0,5ml. As palhetas foram colocadas em uma máquina de congelação (TK 3000®), e a curva seguiu um padrão de resfriamento até 5°C e, posteriormente, até -120°C, onde foram colocadas diretamente no nitrogênio líquido. No experimento 2 (EXP2) foram utilizados sêmen de 3 garanhões da raça Crioula, utilizando os procedimentos de colheita e congelamento descritos no EXP1, entretanto, a centrifugação do sêmen foi realizada sem a adição do diluente G-EDTA e a concentração espermática foi de 50×10^6 espermatozóides/ml. No EXP2 foi utilizado o T0, e a LDL purificada na concentração de 8% T1 no lugar da gema de ovo. O descongelamento do sêmen foi realizado em banho-maria a 37°C / 30s EXP1 e EXP2. No

EXP1 as amostras foram submetidas à análise computadorizada (Computer- Assited Semen Analysis - CASA), onde foram observadas a Motilidade Total (MT%), Velocidade de Trajeto (VAP μ /ms), Velocidade Curvilinear (VCL μ /ms) e Velocidade Progressiva (VSL μ /ms). No EXP2 foram avaliadas a Motilidade Total (MT%) e a integridade da membrana, choque hiposmótico, (CHIPO%). As variáveis respostas foram analisadas através do programa Statitix®, utilizando a análise da variância com medidas repetidas e comparação de médias pela diferença mínima significativa (LSD). No EXP1 a MT% média nos tratamentos T0 (23,3%), T1 (18,0%), T2 (15,1%) e T3 (16,9%), não diferiram entre si ($P>0,05$). A VAP nos tratamentos T0 (86,0 μ /ms) e T1 (81,5 μ /ms) não diferiu ($P>0,05$). O T0 foi superior ($P<0,05$) aos tratamentos T2 (77,2 μ /ms) e T3 (77,9 μ /ms), entretanto, o T1, T2 e T3 foram iguais ($P>0,05$). A VCL nos tratamentos T0 (158,2 μ /ms) e T1 (147,3 μ /ms) não diferiu entre si ($P>0,05$), entretanto, o T0 foi superior ($P<0,05$) aos tratamentos T2 (138,2 μ /ms) e T3 (141,8 μ /ms). A VSL nos tratamentos T0 (61,3 μ 3/ms), T1 (60,6 μ /ms), T2 (58,1 μ /ms) e T3 (57,8 μ /ms), não foi diferente ($P>0,05$). No EXP2 a MT média no tratamento T0 (35,5%) foi inferior ($P<0,05$) ao T1 (48,8%). O CHIPO% nos tratamentos T0 (30,1%) e T1 (27,8%) não diferiu entre si ($P>0,05$) sendo T0 igual a T1. Dessa forma, concluiu-se que a LDL na concentração de 8%, pode substituir a gema de ovo na composição do diluente modificado de Martin *et al.* (1979) utilizado para criopreservar o sêmen eqüino.

Palavras chaves: sêmen, eqüino, LDL, criopreservação

1. Introdução

Um dos primeiros relatos de uso de uma das biotécnicas da reprodução que se tem conhecimento, provém de textos árabes do séc XIV [1], foi a primeira inseminação artificial com sêmen a fresco em cavalos. O processo de criopreservação (congelamento e conservação) de sêmen ocorreu acidentalmente em 1949 quando foi verificado-se que, espermatozóides congelados com diluentes contendo glicerol, permaneciam viáveis após o descongelamento [26]. Mais tarde, Barker e Gardier [27], relatam o sucesso ao obter uma

prenhez em eqüinos com sêmen congelado. Posteriormente, na década de 60, pesquisadores japoneses [2] conseguiram congelar e conservar o sêmen a -70°C .

A espécie eqüina apresenta baixas taxas de natalidade, entre 50 a 60% [28]. Os índices reprodutivos de pôneis em liberdade nas ilhas da costa de Maryland e Virgínia, Estados Unidos, demonstraram uma porcentagem de parição de $57,1 \pm 3,9\%$ [29]. A utilização de biotécnicas da reprodução para incrementar esses índices determinou o uso IA e vários protocolos foram descritos para a manipulação do sêmen, dentre eles a criopreservação descrita por Nishikawa [2]. Sendo assim, o sucesso da conservação do sêmen na inseminação artificial passou a ser importante para a criação de cavalos [30].

Está evidente que, a interação entre espermatozóide e o meio que está a seu redor, é um dos fatores cruciais que afetam a preservação, integridade e habilidade de fertilização dos espermatozóides [8]. No processo de criopreservação além de outros fatores, as substâncias que compõem a fórmula dos diluentes, são fundamentais para que a técnica tenha êxito. A gema de ovo, crioprotetor não-penetrante, é uma das substâncias que freqüentemente é utilizada nos diluentes para a preservação dos espermatozóides dos mamíferos visando a proteção das células durante o processo de congelação e descongelamento, evitando assim, o choque térmico [9]. Evidências indicam, segundo caracterização bioquímica feita por Banaszak et al e Kuksis [14,15] que, a ação protetora dos diluentes que usam a gema de ovo, é atribuída à fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL) [8]. Especulava-se que ocorria a ligação entre a LDL e a membrana espermática [8]. Bergerom *et al.* [17] comprovaram que a LDL promove a entrada de fosfolipídio e colesterol para a membrana e, também, previne a saída de fosfolipídio e colesterol da membrana espermática, formando um complexo com as proteínas do plasma seminal [8,17]. Dessa forma, impede-se que as proteínas do plasma seminal fiquem disponíveis para atuarem na membrana espermática, evitando assim o efluxo de fosfolipídios [17,18] e colesterol [17], conferindo à célula espermática maior resistência ao choque térmico. Os fosfolipídios que se ligam à membrana plasmática como a fosfatidilcolina (lecitina), e componentes de alguns diluentes como a glicose, possuem um efeito energético e garantem a proteção da célula [31,32].

As desvantagens desses diluentes que usam a gema de ovo integral são atribuídas à opacidade óptica, causada pelos grânulos formados, que dificultam o exame imediato à

avaliação microscópica, o prejuízo causado à respiração do espermatozóide [10] a diminuição da motilidade [11] e ainda podem transportar microorganismos patogênicos [12]. Tais particularidades podem ser melhoradas se utilizarmos a fração de LDL em substituição a gema integral dos diluentes, mesmo sabendo que a indústria do cavalo apresenta um grande desafio para a aplicação das técnicas de reprodução assistida [33]. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da substituição da gema de ovo integral, em um diluente utilizado em larga escala, pela LDL em diferentes concentrações, sobre algumas características funcionais dos espermatozoides eqüinos criopreservados.

2. Material e métodos

Este trabalho foi dividido em dois experimentos. No experimento 1 (EXP1), foi avaliada a substituição da gema de ovo integral, componente do diluente modificado de Martin *et al.*(1979) [3] (T0), pela lipoproteína de baixa densidade (LDL) nas concentrações de 8% (T1), 10% (T2) e 12% (T3). No experimento 2 (EXP2), foi comparado o diluente (T0) a LDL 8% (T1).

2.1. Local

Os experimentos foram conduzidos na região Sul do Rio Grande do Sul, nos municípios de Bagé EXP I e Herval EXP II. As análises, Motilidade Total (MT), Velocidade de Trajeto ($VAP\mu/ms$), Velocidade Curvilinear ($VCL\mu/ms$) e Velocidade Progressiva ($VSL\mu/ms$), foram feitas em São Paulo na UNESP (Botucatu).

2.2. Animais

No EXP1 foram selecionados 5 garanhões da raça Puro Sangue Inglês onde cada garanhão foi coletado 4 vezes e o sêmen submetido a 4 tratamentos. A idade média entre os animais foi de 7 a 10 anos e a fertilidade era conhecida. Os animais foram mantidos em pastoreio e suplementados com ração comercial para manutenção da condição corporal. No EXP2, o processo de seleção e alimentação foi semelhante ao EXP1. Três animais da raça Crioula foram selecionados cada animal foi coletado 7 vezes e o sêmen submetido a dois tratamentos.

2.3. Avaliação seminal para seleção e pré congelção

Nos dois experimentos, o sêmen foi avaliado segundo padrões do CBRA, motilidade progressiva ($\geq 70\%$) e patologia espermática ($\leq 30\%$) [33]. O exame de motilidade foi realizado de modo subjetivo através de microscopia óptica (aumento de 200x), utilizando-se aproximadamente 10 μ l em lâmina sob lamínula, ambas pré-aquecidas a 37°C. A morfologia espermática foi avaliada através de contagem de 100 células em lâmina úmida corada com eosina e classificada como espermatozóide normal ou espermatozóide com anormalidade. Após o exame, os garanhões que atingiram o padrão foram selecionados para os experimentos.

As avaliações de motilidade (percentagem de células móveis) e morfologia espermática foram feitas logo após a coleta do sêmen com a finalidade de seleção e imediatamente antes de cada processo de congelção.

2.4. Coleta e preparação do sêmen para congelção

Para a coleta do sêmen foi usada a vagina artificial modelo Hannover e imediatamente após a coleta o sêmen novamente foi submetido à avaliação conforme CBRA [33]. No EXP1 o ejaculado foi filtrado e diluído na proporção 1:1 (V/V) com o diluente para centrifugação, G-EDTA (TABELA 1) [3]. No EXP2, o sêmen não foi diluído e sim centrifugado no próprio plasma seminal. A velocidade de centrifugação foi de 800 x g/5min seguindo o protocolo proposto por Papa *et al.* [34]. O *pellet* formado após a centrifugação, no EXP1 foi ressuspensionado nos tratamentos, T0, T1, T2 e T3, (TABELA 2) sendo a concentração ajustada para 200 x 10⁶ spz/ml. No EXP2 foi ressuspensionado nos tratamentos T0 e T1 e a concentração ajustada para 50 x 10⁶ spz/ml.

TABELA 1 – Composição do diluente G-EDTA para centrifugação do sêmen EXP1

Componentes	Quantidade
Glicose (g)	11,99
Citrato de Na 2H (g)	0,74
EDTA 2 Na (g)	0,74
Bicarbonato de Na (g)	0,24
Antibiótico (UI)	100.000
Água qsp (ml)	200

2.5. *Processamento do sêmen*

O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 ml e logo colocadas na máquina de congelação modelo TK 3000® que seguiu a curva padrão (resfriamento e congelação) [36]. O resfriamento iniciou a temperatura ambiente, baixando 0,25°C/ min até chegar a 5°C onde acontece uma estabilização do diluente e, posteriormente, dá início a curva de congelação que possui dois estágios. No primeiro estágio da congelação, a temperatura baixa 15°C/ min e, no segundo estágio, passa a baixar 10°C/ min até atingir a temperatura de -120°C, onde termina o processo de congelação com a colocação das palhetas direto no nitrogênio líquido, a uma temperatura equivalente a -196°C [36]. Esse processo leva aproximadamente de uma à duas horas visando a diminuição do efeito causado pelo choque térmico.

TABELA 2- Composição dos diluentes utilizados no EXP1

Componentes	T0	T1	T2	T3
Sol. Lactose 11% (ml)	50	50	50	50
G-EDTA (ml)	24	24	24	24
Gema de ovo (ml)	20	-	-	-
LDL (%)	-	8	10	12
Glicerol (ml)	5	5	5	5
Antibiótico (UI)	100.000	100.000	100.000	100.000
Água bidestilada (ml)	100	100	100	100

T0=Modificado de Martin *et al.*(1979); T1= LDL8%; T2=LDL10%; T3=LDL12%

2.6. Descongelamento e Avaliação

As palhetas foram descongeladas a 37°C / 30s como descrito por Dell'aqua [37]. No EXP1 foi usado o processo de avaliação computadorizada (Computer-Assisted Semen Analysis - CASA), desenvolvido por Hamilton Thorne Research, USA [38]. Os parâmetros usados para ajuste do aparelho à espécie equina foram seguidos conforme o manual de operações do aparelho [38] e segundo o padrão de rotinas já estabelecidos, no Laboratório de Reprodução da UNESP- Campus de Botucatu, onde o aparelho encontrava-se. Segundo Arruda [13], os parâmetros são baseados em cálculos físico-matemáticos utilizados em engenharia de computação e de difícil tradução para a linguagem científica utilizada rotineiramente por andrologistas. A análise computadorizada do sêmen de mamíferos segundo Dell'aqua [37] é usada desde 1987 e, em equinos, também [13,39,40,41,42]. Para o EXP1 os padrões usados foram: Motilidade total (MT%); Velocidade de Trajeto (VAP μ /ms); Velocidade Curvilinear (VCL μ /ms) e Velocidade Progressiva (VSL μ /ms). Como padrão, foram utilizados os parâmetros descritos por Arruda [13] encontram-se na (TABELA 3). As amostras foram submetidas à análise computadorizada que as processou em 3 diferentes campos microscópicos e o resultado foi visualizado na tela.

TABELA 3- Parâmetros da motilidade do sêmen equino criopreservado com diluente modificado de Martin *et al.* [3] e avaliados pelo sistema CASA.

Parâmetros	Padrões
Motilidade Total (MT%)	(≥ 30)
Velocidade de Trajeto (VAP μ /ms)	(≥ 65)
Velocidade Curvilinear (VCL μ /ms)	(≥ 110)
Velocidade Progressiva (VSL μ /ms)	(≥ 57)
Arruda [13]	

No EXP2 as avaliações de motilidade foram feitas de modo subjetivo através de microscopia óptica (aumento de 200x, com contraste de fase), utilizando-se, aproximadamente, 10 μ l em lâmina sob lamínula, ambas pré-aquecidas a 37 °C. O teste de integridade de membrana, avaliado pelo choque hiposmótico (CHIPO), foi realizado

segundo Dell'Aqua [43]. Uma gota de sêmen foi diluída em dezenove gotas de água bidestilada (1:20) com osmolaridade 0mOsmol/Kg aquecida a 37°C e logo levada ao microscópio óptico, contagem de 200 células, para a identificação das lesões de cauda causadas pela diferença de osmolaridade. Uma alíquota de sêmen também foi retirada para que a morfologia espermática fosse feita. Com estes dois resultados através do diferencial existente entre as células com patologia de cauda, e as que tiveram a cauda dobrada pela osmolaridade 0, expresso em percentagem, obteve-se o resultado do teste CHIPO.

2.7. *Análise estatística*

Os dados foram analisados segundo o programa *Statistix*® [44] através da análise da variância com medidas repetitivas e, a comparação de médias, pela diferença mínima significativa (LSD).

3. Resultados

Experimento 1:

As médias da motilidade e velocidades analisadas no (CASA) (TABELA 4), demonstraram que a MT dos espermatozóides nos tratamentos T0 (23,3%), T1(18%), T2(16,9%) e T3(15,1%) não diferiram entre si ($P>0,05$). O padrão VAP dos tratamentos T0 (86,0 μ /ms) e T1 (81,5 μ /ms) não diferiu ($P>0,05$). Entretanto o T0 foi superior ($P<0,05$) aos tratamentos T2 (77,2 μ /ms) e T3 (77,9 μ /ms), enquanto que o T1, T2 e T3 foram iguais ($P>0,05$). A VCL dos tratamentos T0 (158,2 μ /ms) e T1 (147,3 μ /ms) não diferiu entre si ($P>0,05$), entretanto, o T0 foi superior ($P<0,05$) aos tratamentos T2 (138,2 μ /ms) e T3 (141,8 μ /ms). A VSL dos tratamentos T0 (61,3 μ^3 /ms), T1 (60,6 μ /ms), T2 (58,1 μ /ms) e T3 (57,8 μ /ms), não foi diferente ($P>0,05$).

TABELA 4- Valores médios da motilidade total e velocidades de trajeto, curvilinear e progressiva dos espermatozóides eqüinos criopreservados.

Variáveis	T0 (n=20)	T1(n=20)	T2 (n=20)	T3 (n=20)
Motilidade Total (MT%)	23,3 a	18,0 a	16,9 a	15,1 a
Velocidade de Trajeto (VAP μ /ms)	86,0 a	81,5 ab	77,9 b	72,5 b
Velocidade Curvilinear (VCL μ /ms)	158,2 a	147,3 ab	141,8 b	138,2 b
Velocidade Progressiva (VSL μ /ms)	61,3 a	60,6 a	58,1 a	57,8 a

Médias dentro da mesma linha com letras diferentes diferem entre si estatisticamente (P<0,05)

T0=Modificado de Martin *et al.* [3]; T1=LDL8%; T2=LDL10%; T3=LDL12%

Experimento 2:

A análise das médias da MT no tratamento T0 (35,5%) foi inferior (P<0,05) ao T1 (48,8%) e o teste de integridade de membrana, avaliação através do CHIPO, nos tratamentos T0 (30,1%) e T1 (27,8%) não diferiram entre si (P>0,05) (TABELA 5).

TABELA 5- Valores médios da motilidade total MT% e média do choque hiposmótico CHIPO %

Padrões	T0 (n=21)	T1 (n=21)
Motilidade (%)	35,5 b	48,8 a
CHIPO %	30,1 a	27,8 a

Médias dentro da mesma linha com letras diferentes diferem entre si estatisticamente (P<0,05)

T0= Modificado de Martin *et al.* [3] / T1= LDL8%

4. Discussão

Com base nos experimentos realizados, recomenda-se a adição de 8% LDL em substituição a gema de ovo integral, componente original descrito no diluente modificado de Martin *et al.* [3]. Segundo caracterização bioquímica feita por Banaszak *et al* [14] e Kuksis [15], a ação protetora dos diluentes que usam a gema de ovo é atribuída à fração lipoprotéica de baixa densidade (LDL) [8]. A LDL é composta por 12% de proteínas, 87% lipídios e apresenta um formato esférico medindo aproximadamente 35 μ m. A LDL é extremamente solúvel em meios à base de água, devido a sua baixa densidade, e não

precipita após algumas horas, promovendo um filme interfacial entre ácidos graxos e a água [16].

Especulava-se que ocorria a ligação entre a LDL e a membrana espermática [8]. Bergerom *et al* [17] comprovaram que a LDL promove a entrada de fosfolípido e colesterol para a membrana e, também, previne a saída de fosfolípido e colesterol da membrana espermática, formando um complexo com as proteínas do plasma seminal [8,17]. Dessa forma, impede que as proteínas do plasma seminal fiquem disponíveis para atuarem na membrana espermática evitando, assim, o efluxo de fosfolípidios [18,17] e colesterol [17], conferindo à célula espermática maior resistência ao choque térmico. A ação crioprotetora da LDL, similar a da gema de ovo, quando utilizada nos diluentes de criopreservação, tem sido comprovada na espécie equina [19], bovina [9,20], suína [21], canina [22], peixes [23] e em outras espécies [24].

O sistema de análise computadorizada do sêmen (CASA) é, segundo alguns autores [45,46,47], o método mais moderno e preciso de analisar o movimento dos espermatozoides e, além disso, o sistema permite, em poucos segundos, efetuar o exame de vários parâmetros espermáticos. Arruda [13] concluiu que para o sêmen equino criopreservado com o diluente modificado de Martin *et al.* [3] os valores mínimos desejáveis são: Motilidade Total ($\geq 30\%$); Velocidade de Trajeto (VAP $\geq 65\ \mu/\text{ms}$); Velocidade Curvilinear (VCL $\geq 110\ \mu/\text{ms}$) e Velocidade Progressiva (VSL $\geq 57\ \mu/\text{ms}$). No EXP1 constatou-se que a MT foi menor que 30% em todos os tratamentos. Atribui-se esta baixa motilidade a alta concentração de células (200×10^6 spz/ml), existentes nas amostras, dificultando a análise do padrão MT, pois o software do CASA, conta como imóveis as células que estavam agrupadas e em atividade em relação as células que permaneciam em movimento isoladas no campo microscópico. O padrão de MT é calculado sobre a quantidade de células que se movimentam no campo microscópico em relação as que estão imóveis, podendo partículas do tamanho de uma célula interferir nos resultados. As outras variáveis analisadas, VAP, VCL e VSL, trajeto relacionados as células isoladamente, não foram afetadas pela alta concentração, pois as mesmas apresentaram valores semelhantes aos verificados por Arruda [13].

O EXP2 foi realizado com o objetivo de confirmar que a MT, em função da concentração de células espermáticas na palheta, havia sido prejudicada na avaliação pelo

sistema CASA, no EXP1 e, que a concentração de 8% de LDL (T1), poderia substituir a gema de ovo integral, no diluente modificado de Martin *et al.* [3], com a mesma eficiência. Portanto, o tratamento controle (T0) e o tratamento T1, nos quais foram constatados os melhores valores dos parâmetros de velocidade de trajeto e curvilíneo no EXP1, foram avaliados, utilizando-se sêmen de eqüinos da raça Criola. Os resultados obtidos no EXP2, demonstraram a superioridade da MT utilizado-se LDL, no diluente modificado de Martin *et al.* [3], em relação a gema de ovo integral. Também os resultados de MT observados, sugerem que a concentração de células (200×10^6 spz/ml) usadas nas palhetas avaliadas no EXP1, foi prejudicial na avaliação do parâmetro MT quando da utilização do CASA, para todos os tratamentos.

A média da MT do T0 no EXP2, foi semelhante as médias observadas por Martin *et al.* (1979) [3] usando o mesmo diluidor, confirmando portanto, a superioridade da utilização da LDL. Na avaliação da integridade de membrana, a média de 29,1% para sêmen eqüino criopreservado, descrito por Dell'Aqua [43], é compatível com as médias observadas nos tratamentos realizados no EXP2, confirmando, portanto, a ação protetora da LDL 8%.

Baseado nos dados obtidos nos dois experimentos realizados, concluiu-se que a LDL na concentração de 8%, pode substituir a gema de ovo integral na composição do diluente modificado de Martin *et al.* [3], utilizado para criopreservar sêmen eqüino.

Bibliografia

- [1] Long CR, Walker SC, Tang RT, Westhunsin ME. New comercial opportunities for advanced reproductive technologies in horses, wildlife and companion animals. *Theriogenology* 2003; 59:139-49.
- [2] Nishikawa Y, Waide Y, Shinimiya S. Studies on deep-freezing of horse spermatozoa. 6th Int Congr. Anim. Reprod. AI 1968;2:1589-1591.
- [3] Martin JC, Klug E, Gunzel AR. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straw. *J. Repro. Fertil. Suppl* 1979;27:47-51.
- [4] Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V, Torner H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science* 2001;65:75–88.
- [5] Loomis PR. The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science* 2001;68:191–200.
- [6] Samper JC. Management and fertility of mares bred with frozen semen. *Animal Reproduction Science. Sci* 2001;68:219-228.
- [7] Vidament M., Duperere AM, Juliene P, Evain A, Noue P, Palmer E. Equine frozen semen freezability and fertility field results. *Theriogenology* 1997;48:907-917.
- [8] Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Menard M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. *Biology of Reproduction* 2002;67:1250-1258.
- [9] Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective affect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 2002;57:1695-1706.
- [10] Totic PH, Walton A. Effects of egg yolk and its contituents on the respiration and fertilizing capacity of spermatozoa. *J Agric Sci* 1946;37:69-76.
- [11] Pace MM, Graham EF. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci* 1974;39:1144-1149.
- [12] Bosseau S, Brillard JP, Marquant-le guienne B, Guérin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* 1998;50:699-706.
- [13] Arruda, R.P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescencia, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade CASA e da morfometria ASMA. UNESP, Tese para obtenção do título de Livre Docente UNESP-Botucatu 2000.
- [14] Banaszak L, Sharrock W, Timmins P. Structure and function of a lipoprotein: lipovitellin. *Annu Rev Biophys Chem* 1991; 20:221–246.
- [15] Kuksis A. Yolk lipids *Biochimica et Biophysica* with an emphasis on the importance of protein hydrophobicity *Acta* 1992;1124:205–222.
- [16] Anton M, Martinet V, Dalgalarondo M, Beaumal V, David-Briand E, Rabesona H. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins from hen egg yolk. *Food Chemistry* 2003;83:175–183.

- [17] Bergeron A, Crete MH, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod* 2004;70:708-717.
- [18] Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. 1999;61:590-598.
- [19] Juliani G, Henry M, Melo VI. Freezing of equine semen in extenders with low density lipoproteins. 15th International Congress on Animal Reproduction. Porto Seguro-BA. CBRA- ICAR- 2004:p.498.
- [20] Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gerard O, Courtens JL, Anton M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 2004;61:895-907.
- [21] Demaniowicz W, Strzezek J. The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reprod Dom Anim* 1996;31:279-280.
- [22] Varela Jr. Efeito da Lipoproteína de baixa densidade sobre a qualidade do sêmen canino submetido a criopreservação. Dissertação de Mestrado –UFPEL Pelotas-RS 2005.
- [23] Babiak I, Glogowski J, Goryczko K, Dobosz S, Kuzminski H, Strzezek J, Demianowicz W. Effect of extender composition and equilibration time on fertilizationability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. *Theriogenology* 2001;56:177-192.
- [24] Quinn PJ, Chow PYW. Evidence that phospholipids protects spermatozoa from cold shock at a plasma membrane. *J Reprod Fertil* 1980;60:403-407.
- [25] Perry EJ, Historical In: Perry EJ The Artificial insemination of farm animals. Rutgers University Press New Brunswick. 1945:p.3-8.
- [26] Polge C, Smith AU, Parks AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949;164:666.
- [27] Barker CAV, Gandier JCC. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 1957;2:47-51.
- [28] Merkt H, Jacobs KO, Klug E, Aukes E. An analysis of stallion fertility rates (foals born alive) from the breeding documents of the Landgestüt Celle over a 158-year period. *J. Reprod. Fert., Suppl* 1979;27:73-77.
- [29] Keiper R, Houpt K. Reproduction in feral horses: An eighty-year study. *Am. J. Vet. Res.* 1984;45:991-995.
- [30] Blottner S, Warnke C, Tuchscherer A, Heinen V, Torner H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Animal Reproduction Science* 2001;65:75–88.
- [31] Mies Filho A. Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial. 5ª Ed. Editora Sulina 1982:p.499-602.
- [32] Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Biossíntese de Lipídios. In: *Princípios de Bioquímica*. Editora Sarvier 1995: p.494-495.
- [33] Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, CBRA–Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Edição, Belo Horizonte, 1998.
- [34] Papa FO *et al.* A comparative study between freezability and fertility of stallion semen using different extenders. *Baltimore proceedings* 1998:140-141.

- [35] Picket BW *et al.* Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. *Fertil. Steril* 1975;26:167-174.
- [36] TK 3000® Manual da máquina de congelação. TK Congelamento Ltda. Uberaba-MG 2004.
- [37] Dell'aqua JA. Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado equino. Dissertação de Mestrado, Botucatu-SP 2000.
- [38] CEROS- versão 10.8, Operation manual HTM-CEROS, Hamilton Thorne 1999.
- [39] Amann RP, Pickett BW. Principle of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Vet. Sci* 1987;7:145.
- [40] Jasko DJ. Objective analysis of stallion sperm motility. *Theriogenology* 1988;39:1159-1167.
- [41] Vanner DD, Vaughan SD, Johnson L. Use of computerized system for evaluation of equine spermatozoa motility. *Anim. Journal Vet. Res.* 1991;52:224.
- [42] Ferreira JCP, Papa FO, Neves Neto Jr. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal 12º Belo Horizonte – MG 1997;p.131-133.
- [43] Dell'aqua JA *et al.* Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2002;26:189-191.
- [44] Statistix®. Analytical Software. User's manual. Tallahassee, FL. 2003. 396 p.M
- [45] Mack SO, Wolf DP, Tash JS. Quantification of specific parameters of motility in large number of human sperm by digital image processing. *Biol. Reproduction*, 1988;38:270-81.
- [46] Amann RP. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately. *J. androl.* 1989;10:89.
- [47] Vantman D, Banks SM, Koukoulis G. Assessment of sperm motion characteristics from fertile and infertile men using a fully automated computer-assisted semen analyser. *Fertil. Steril.* 1989;51:156-61.