

Aplicação da criopreservação em sêmen equino

Application of cryopreservation in equine semen

Camila da Silva CASTRO [1](#); Klayto José Gonçalves SANTOS [2](#); Aracele Pinheiro Pales dos SANTOS [3](#); Rafael Alves da Costa FERRO [4](#); Diogo Alves da Costa FERRO [5](#); Raiany Soares de PAULA [6](#); Jaqueline Ferreira Daniel SANTOS [7](#)

Recibido: 18/04/2017 • Aprobado: 19/05/2017

Conteúdo

[1. Introdução](#)

[2. Revisão de literatura](#)

[3. Considerações Finais](#)

[Referências bibliográficas](#)

RESUMO:

A criopreservação de sêmen equino vem crescendo no país, devido ao interesse comercial pelo uso da técnica de inseminação artificial associada com sêmen congelado. Contudo as dificuldades encontradas com o uso desta prática para sêmen equino, pelas diferenças individuais de congelabilidade e reduzida capacidade características dos espermatozoides equinos de resistirem aos danos causados pelos processos de congelamento, evidenciam a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas e estudos em busca de diferentes diluentes crioprotetores que agreguem melhores resultados ao processo.

Palavras chave: Crioprotetores. Diluentes. Garanhões. Reprodução equina.

ABSTRACT:

Cryopreservation of equine semen has been increasing in the country, due to the commercial interest in the use of the artificial insemination technique associated with frozen semen. It contains the difficulties encountered with the use of this practice for equine semen, by the individual differences freezing and reduced ability of equine spermatozoa to withstand damage caused by freezing processes, thus evidencing a need to develop new techniques and studies in the search of different cryoprotective diluents that add better results to the process.

Keywords: Cryoprotectants. Diluents. Equine reproduction. Stallions.

1. Introdução

O Brasil é o terceiro maior criador de cavalos do mundo, com quase seis milhões de cabeças, perdendo apenas para China e México. A maior população desses animais encontra-se na região Sudeste, logo em seguida aparecem nas regiões Nordeste, Centro- Oeste, Sul e Norte. A equideocultura no país gera milhões de empregos diretos e indiretos, movimentando R\$ 7,3 bilhões por ano com essa produção, confirmando assim a dimensão da equideocultura que forma no Brasil uma importante cadeia do agronegócio, com forte interação com setores ligados ao lazer,

cultura e turismo (Brasil, 2016).

A equinocultura no país está em expansão onde a intensificação e tecnificação das criações estão sendo cada vez mais requeridas. Assim a utilização de biotécnicas reprodutivas como a Inseminação Artificial (IA) e a Transferência de Embriões (TE) está crescendo para melhorar a produção (Farias, 2013). Na equideocultura mundial é cada vez maior a utilização do sêmen congelado devido à recente liberação do seu uso por grande parte das associações dos criadores. Dada a notoriedade do interesse comercial pelo uso da técnica de IA com sêmen congelado, pesquisas na área de criopreservação de sêmen equino têm sido constantemente desenvolvidas (Zimmermann et al., 2009).

A utilização da criopreservação de sêmen iniciou-se há aproximadamente 60 anos com a descoberta do glicerol como crioprotetor. Essa descoberta permitiu que os espermatozoides fossem congelados, armazenados por tempo indeterminado e usados com sucesso na inseminação artificial. Sabe-se que boa parte dos garanhões não responde bem a essa biotécnica, o que faz com que o número de pesquisas nesse sentido venha aumentando cada vez mais, com o intuito de superar a variação individual (Vidament, 2005).

A prática de criopreservação tem sido continuamente modificada e melhorada, sendo notoriamente mais bem sucedida em bovinos do que em outras espécies domésticas. (HAFEZ, 2004). A criopreservação de sêmen equino vem crescendo por proporcionar a possibilidade de um melhor aproveitamento genético de animais de grandes valores econômicos e zootécnicos, devido à facilidade de transporte e armazenamento do material genético de garanhões por longo período de tempo (Oliveira et al., 2013a).

Entretanto, a fertilidade do sêmen congelado ainda é baixa e isto dificulta a sua utilização em larga escala, pois o uso do sêmen equino congelado encontra dificuldades pelas diferenças individuais de congelabilidade espermática existente entre garanhões, ejaculados do mesmo indivíduo e também pela reduzida capacidade dos espermatozoides equinos de resistirem aos danos causados pelos processos de congelamento e descongelamento (candeias, 2010).

No entanto a utilização da criopreservação de sêmen equino apresenta vantagens como armazenamento do sêmen congelado por tempo indeterminado; utilização do sêmen de animais excepcionais mesmo após a perda da capacidade reprodutiva ou morte; maximização do número de descendentes de um único reprodutor; controle de doenças sexuais e facilidade no transporte a longas distâncias. No entanto, o processo encontra desafios como a variabilidade do congelamento de sêmen entre garanhões e o transporte de garanhões a centros especializados em congelamento (De Vita et al., 2011).

Por isso é de grande importância ressaltar os diferentes tipos de protocolos de crioprotetores, diluidores e curvas de congelamento utilizados na criopreservação, para que se adapta a cada protocolo para cada indivíduo (Oliveira et al., 2013a). Diante das necessidades de novos estudos nessa área objetivou-se fazer um revisão de literatura destacando a aplicação do processo de criopreservação de sêmen, bem como os principais crioprotetores utilizados no congelamento de sêmen de garanhões.

2. Revisão de literatura

2.1. Criopreservação de sêmen

A criopreservação é uma tecnologia por meio da qual células, tecidos ou embriões são preservados a temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água, tendo como premissa a preservação da composição e da viabilidade das células por tempo indefinido (PEGG, 2002).

Os primeiros relatos de criopreservação de sêmen vêm da descoberta do glicerol como crioprotetor, há aproximadamente 60 anos, permitindo assim que os espermatozoides fossem congelados, armazenados por tempo indeterminado e utilizados com sucesso na IA (Vidament, 2005). Desde então várias técnicas têm sido testadas para a criopreservação espermática

utilizando diferentes velocidades e meios de centrifugação, curvas e meios de congelamento, crioprotetores e suas concentrações, bem como protocolos de descongelamento, embora ainda não haja uma metodologia de congelamento universalmente específica para a espécie (Oliveira, 2013).

O processo de criopreservação de sêmen promove grande estresse celular e impõe aos espermatozoides condições desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade (PURDY, 2006). Passando pelas fases de diluição do sêmen fresco, centrifugação, adição do diluente crioprotetor de congelamento, refrigeração, preenchimento das palhetas e congelamento.

Provoca várias situações de estresse para as células espermáticas que podem comprometer a viabilidade das mesmas após o descongelamento, devido ao grande estresse térmico, mecânico, químico e osmótico que é imposto aos espermatozoides, especialmente à sua membrana plasmática, além da formação de cristais de gelo intracelulares. Com o intuito de proteger os espermatozoides dos efeitos críticos de criopreservação e estabilização dos componentes da membrana plasmática, são utilizados diluentes tanto no processo de resfriamento, quanto no congelamento (Watson, 2000; GONÇALVES e NEVES, 2011).

A passagem da membrana plasmática do seu estado líquido para seu estado cristalino, é a fase de transição que provoca mais danos a integridade da membrana espermática. O resfriamento provoca mudanças na forma estrutural das moléculas de fosfolipídios, impossibilitando a movimentação aleatória dessas proteínas, o que resulta em aumento de permeabilidade da membrana e decréscimo da atividade metabólica (Amann e Pickett, 1987).

Quaisquer modificações na organização em mosaico fluído da membrana, como assimetrias na bicamada lipídica e sua interação com as proteínas, podem provocar alterações nos receptores de membrana, o que altera suas funções. A membrana plasmática afetada pelo frio pode sofrer mudanças na sua permeabilidade, que resulta em alterações funcionais e metabólicas, prejudicando a motilidade e a capacidade fecundante dos espermatozoides (Nunes et al., 2006).

Os espermatozoides dos ganhões respondem de maneira diferente à criopreservação, produzindo na sua maioria sêmen de intermediária ou má qualidade com relação à congelabilidade. De acordo com Candeias (2010) que avaliando 80 ganhões das raças Hannoveriano, Holsteiner, Trackner e Quarto de Milha, percebeu que metade apresentaram bons padrões de motilidade no sêmen pós-descongelamento. No entanto, nas raças como Mangalarga e Mangalarga Marchador, esse percentual caiu para apenas 15%, demonstrando que há variação entre raças e muitas vezes variação individual relacionado a congelabilidade e o uso do glicerol. Pode-se constatar que além das diferenças individuais entre a espécie equina existe um fator racial que interfere na resistência espermática ao congelamento.

Apesar de apresentar baixa eficiência, por mostrar diferenças individuais com relação a sua preservação (Lagares et al., 2000) a criopreservação de sêmen equino faz-se necessária devido as exigências do mercado, pois viabiliza a criação de bancos de armazenamento de material genético de alto valor agregado por longos períodos (Terraciano et al., 2008).

Buscando melhorar os resultados e minimizar esses efeitos agressivos do congelamento e descongelamento, adiciona-se aos meios diluidores agentes crioprotetores.

2.2. Agentes crioprotetores

Os agentes que constituem bons diluidores tem, entre outras, as funções de proporcionar nutrientes como fonte de energia, proteger as células espermáticas do efeito prejudicial do resfriamento rápido e durante o congelamento (Hafez, 2004). Assim o uso de crioprotetores que possuem função de proteger as células e tecidos dos efeitos deletérios causados na morfologia dos espermatozoides durante o congelamento e descongelamento faz se necessário independente das técnicas ou protocolos utilizados (Alvarenga et al., 2005).

Os crioprotetores são divididos entre penetrantes ou intracelulares, como glicerol e amidas, e

não penetrantes ou extracelulares, como proteínas do leite e da gema de ovo e açúcares. Os crioprotetores capazes de atravessar a membrana plasmática do espermatozoide como os penetrantes, devido ao pequeno tamanho molecular, são essenciais para minimizar ou prevenir a formação de cristais de gelo intracelular. Por sua vez os que não têm essa capacidade, pelo seu maior tamanho das partículas, como os não penetrantes, auxiliam na estabilização da membrana plasmática durante o processo de congelamento e descongelamento (Amann e Pickett, 1987).

2.2.1. Álcoois

O glicerol, um álcool polihídrico altamente permeável, é usado quase que universalmente como agente crioprotetor para congelar sêmen (Hafez, 2004). No entanto se utilizado em altas concentrações apresenta toxicidade para a célula e compromete a fertilidade (Amann e Pickett, 1987). A maioria dos diluidores utilizados para o congelamento contém entre 2,5 a 5 % de glicerol em sua composição (Candeias, 2010).

O etilenoglicol, também é definido como álcool, pode realizar ligações de hidrogênio na membrana do espermatozoide (Kundu, 2000). Estudos comparativos realizados por Alvarenga et al. (2000) entre glicerol e etilenoglicol demonstraram atuação semelhante destes, sendo que a combinação possibilita a redução do teor de glicerol, diminuindo o seu efeito tóxico. Já Arruda (2000) avaliou a substituição do glicerol pelo etilenoglicol como agente de criopreservação de sêmen equino, concluindo que ambos apresentam basicamente as mesmas propriedades crioprotetoras.

2.2.2 Amidas

As amidas são compostos orgânicos formadas por três pontos de ligação ao hidrogênio, portanto três ligações a menos que o glicerol, sendo assim menos viscosas e menos solúveis em água, o que leva à menor permeabilidade da membrana. Característica esta que é favorável na criopreservação, pois diminui a possibilidade de danos celulares por estresse osmótico (Ball e Vo, 2001). As amidas apresentam resultados favoráveis nos diversos parâmetros espermáticos avaliados, em especial para ganhões que apresentam resultados desfavoráveis ao uso de glicerol (Alvarenga et al. 2000).

A dimetilformamida é uma das amidas que vem sendo bastante utilizada por melhorar os processos de vitrificação e estabilização em água, superando o glicerol, se mostrando eficiente para a criopreservação de tecidos vivos (Baudot e Boutron, 1998). Outro estudo mais recente relatou que a dimetilformamida protege as células espermáticas do ganhão dos efeitos deletérios do processo de criopreservação (Medeiros, 2003).

Em experimento utilizando diluidor de congelamento a base de gema de ovo e leite, com variação do crioprotetor de: (1) 5% glicerol; (2) 5% dimetilformamida; (3) 5% metilformamida; (4) 3% de dimetilacetamida, e realizando análise computadorizada da motilidade total e progressiva após o descongelamento, demonstraram superioridade da dimetilformamida e metilformamida para o congelamento de sêmen de ganhões da raça Mangalarga Marchador e baixo resultado no congelamento obtido quando o glicerol foi usado como crioprotetor (Gomes et al., 2002).

2.2.3 Proteínas

A gema de ovo é largamente utilizada na composição dos diluidores, por conter lecitina, a qual se acredita proteger a membrana espermática por restaurar os lipídios perdidos durante o choque térmico (Watson, 1995). Trabalhando com aspectos relacionados ao congelamento de sêmen concluiu-se que a porção proteica de baixa densidade da gema de ovo protege as células espermáticas do choque térmico, da fase de transição dos lipídeos e dos danos causados a membrana pelas temperaturas abaixo do ponto de congelamento da solução (Holt, 2000). As concentrações de gema de ovo nos diluidores usados para congelamento de sêmen equino variam de 2 a 20%, dependendo do diluidor utilizado e do nível de glicerol e leite (Clulow et al. 2007).

Através da adição de 20% de gema de ovo de galinha ou 20% de gema de ovo de ema em amostras de dois diluentes comerciais à base de gema de ovo, leite desnatado e glicerol ou aminoácidos, glicídios, gema de ovo, glicerol e dimetilformamida, Linden (2012) concluiu que a gema de ovo de ema pode ser uma alternativa para produção de diluentes para congelamento de sêmen de equinos, contudo uma redução na integridade da membrana plasmática foi observada quando associado ao diluente que usa apenas glicerol com crioprotetor.

As proteínas do leite exercem um papel na criopreservação, semelhante ao da gema de ovo, não sendo, contudo capaz de substituí-la plenamente. O leite é mais utilizado para diluir e armazenar o sêmen *in natura* ou refrigerado. Os diluidores para sêmen equino comercializados no Brasil são EZ – Mixin® (CST), Max Sêmen® (Agrofarma); Botu-Sêmen® e Botu-Turbo® (Biotech Botucatu) Equimix® (Nutricell), sendo que todos utilizam leite e ou derivados em sua composição (Raphael, 2007).

Segundo Freitas (2013) o leite desnatado UHT, utilizado como único diluente do sêmen para a centrifugação durante o processo de congelamento é suficiente para a proteção do espermatozoide. Através de experimento avaliou 14 ejaculados equinos divididos em dois grupos, grupo controle (diluição 1:1 em meio comercial Botu-Sêmen®) e grupo leite (diluição 1:1 em leite desnatado UHT) para o processo centrifugação e posterior adição de crioprotetor (Botu-Crio®) para congelamento em ambos os grupos. Os resultados pós- descongelamento obtidos através das avaliações da cinética espermática, da integridade de membrana plasmática e de membrana acrossomal, e da viabilidade espermática, demonstraram que não houve diferença, na utilização do leite desnatado na centrifugação em relação ao diluente comercial.

2.3. Coletas e avaliação de sêmen equino

O sêmen pode ser satisfatoriamente coletado em garanhões com 24 meses de idade, com o número de espermatozoides por ejaculado variando entre sete e quinze bilhões, volume de 60 a 100 ml, sujeito a sofrer variações estacionais. Após a coleta do sêmen, sua qualidade e quantidade devem ser verificadas por meio do exame andrológico (AX et al., 2004). As características do sêmen são influenciadas pelo grau de estimulação sexual, frequência de ejaculação, idade, tamanho, testicular e método de coleta (Hafez & Hafez, 2004).

A coleta pode ser realizada em manequim ou na própria égua no cio, estimulando o garanhão a ejacular dentro da vagina artificial, a qual deve simular condições anatômicas semelhantes as apresentadas no interior da vagina da égua (Martins, 2011). A mucosa interna da vagina deve ser preenchida com água morna aproximada a 45°C e completada com ar afim de atingir pressão suficiente para causar atrito e estimular o macho (Berber, 2015).

Esse processo inicia-se com a preparação da vagina, passando pela excitação e limpeza do pênis, seguida da monta, terminando com a ejaculação. Após coletado o sêmen deve ser rapidamente transportado ao laboratório para a avaliação e posterior processamento (Ax et al., 2004), podendo ser utilizado fresco, diluído e resfriado, ou congelado que sugere maior flexibilidade de manejo.

As avaliações laboratoriais básicas com o objetivo de estimar o potencial de fertilidade de uma partida de sêmen e que seguem os padrões mínimos exigidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) para avaliação do sêmen, *in natura* ou criopreservado, são: motilidade espermática (%); vigor (1-5); concentração espermática (milhões/ml); anormalidades espermáticas (%) e teste de integridade de membrana plasmática e acrossomal (Arruda et al., 1992).

Segundo o CBRA (2013) a motilidade é expressa em porcentagem (0 a 100%) a proporção de espermatozoides móveis, através de avaliações subjetivas de uma gota de sêmen em microscópio binocular ou métodos mais precisos como avaliação computadorizada. O vigor representa a força do movimento e conseqüente velocidade com que os espermatozoides se movimentam, sendo classificado de 0 a 5, onde zero é a ausência de movimento progressivo, exclusivamente oscilatório e cinco resulta em movimento retilíneo progressivo e muito rápido.

Já a concentração representa o número de espermatozoides por cm^3 ou ml, onde o procedimento mais comum de cálculo é pela contagem das células na câmara de Neubauer, de forma mais exata pela espectrofotometria ou métodos computadorizados.

Os valores padrões seminais desejáveis para efeito de seleção de garanhões para monta natural são 70% de motilidade progressiva, vigor 3 e total de espermatozoides anormais máximo de 30%. Serão considerado fora do padrão para sêmen refrigerado e congelado os que apresentarem motilidade progressiva menor que 30%, vigor abaixo de 3, acima de 40% de anormalidades espermáticas e número de espermatozoides com motilidade progressiva no ato da inseminação ou no pós-descongelamento menor que 200 bilhões por dose (CBRA, 2013).

Alguns equipamentos foram desenvolvidos para facilitar essas avaliações e minimizar as imprecisões das análises subjetivas realizadas sob uso de microscopia óptica, tornando-as computadorizadas. O exemplo dos aparelhos CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), que apresenta relevância na determinação do potencial genético de fertilidade dos espermatozoides através da avaliação automatizada da motilidade, e Citômetro de Fluxo que tem sido utilizado para avaliar a integridade da membrana plasmática e o estado do acrossoma do espermatozoide equino, essencial para o funcionamento do mesmo (Arruda et al., 2007).

2.4 Congelamento e descongelamento de sêmen equino

Durante o processo de criopreservação o sêmen deve ser refrigerado da temperatura corpórea à temperatura ambiente (37° a 20° C), sem ocasionar danos ao espermatozoide. Para isto é necessário diluir o sêmen em meio adequado. O estresse inicial se dá devido a transição da membrana plasmática do estado líquido para o estado de gel, quando o espermatozoide é submetido a temperatura de refrigeração a 5° C (Squires et al., 1999; Soares e Guerra, 2009). As taxas de resfriamento podem ser divididas dentro de três categorias: lentas ($<0,33^\circ\text{C}/\text{min.}$); médias ($0,33^\circ\text{C}/\text{min.}$ a $1,0^\circ\text{C}/\text{min.}$) e rápidas ($>1,0^\circ\text{C}/\text{min.}$) segundo Douglas-Hamilton et al. (1984).

De acordo com Amman e Pickett (1987) na maioria dos protocolos para o congelamento é utilizada uma curva de congelamento rápida de $-60^\circ\text{C}/\text{min.}$, sendo obtida pela exposição das palhetas horizontalmente, três cm acima do vapor de nitrogênio, durante 20 minutos. Estes pesquisadores também concluíram que o descongelamento de amostras contidas em palhetas com capacidade para 0,5 ml, deve ser feito à temperatura de 37° C por 30 segundos.

Dentre os tipos de curvas de congelamento utilizadas, na curva lenta os espermatozoides sofrem danos por excessiva desidratação da célula, impedindo a formação de cristais de gelo intracelular, porém altas concentrações de soluto podem gerar lesões nas células. Se congelados muito rápido, os espermatozoides não perdem água suficiente, provocando a formação de cristais de gelo intracelular, que geram danos irreversíveis. Sendo assim a curva de congelamento deve ser suficientemente lenta para permitir a saída de água de dentro da célula evitando os cristais de gelo, e suficientemente rápida para minimizar os danos causados pela exposição prolongada a concentrações altas de solutos (Watson, 1995).

O processo de descongelamento depende do método em que o sêmen foi congelado, a curva de aquecimento deve acompanhar a velocidade com que ocorreu o congelamento. Assim se a curva de congelamento utilizada foi lenta, a de descongelamento também deve ser lenta, permitindo a reidratação da célula e quebrando os cristais de gelo intracelulares. E vice e versa, caso o sêmen tenha sido congelado rapidamente, também deve ser descongelado na mesma velocidade possibilitando assim que o gelo intracelular formado não tenha tempo de recristalizar (Amman e Pickett, 1987).

As máquinas de congelamento automático e programáveis surgiram com o intuito de facilitar e objetivar o processo de criopreservação. Estão sendo utilizadas por serem convenientes para o congelamento de grandes quantidades de palhetas de sêmen, além de controlar a taxa de congelamento. O benefício do congelamento automatizado é que a curva de refrigeração pode ser programada, por exemplo, 4 a 5° C por 4 min., de -5 a -110° C por 25 min. e de -110 a

-140° C por 35 min. e, somente então, as palhetas de sêmen são mergulhadas em nitrogênio líquido (Purdy, 2006).

Foram avaliadas amostras de 36 ejaculados equino em três curvas diferentes de congelamento programadas em máquina automatizada (TK3000®). O período de resfriamento a 5° C foi controlado para todos os tratamentos em uma curva automatizada de 0,5° C/min. O tratamento controle foi congelado em caixa de isopor contendo nitrogênio líquido, na qual as palhetas eram dispostas a 6 cm do nível do nitrogênio por 20 minutos e congeladas por imersão direta no mesmo. Já as curvas programadas na máquina foram: Curva 1: 15°C/min. entre +5°C e -60°C 4°C/min. entre -60°C e -100°C; Curva 2: 20°C/min. entre +5°C e -100°C e Curva 3: 20°C/min. até -60°C e posteriormente a uma curva de 10°C/min. entre -60°C e -100°C. Concluindo que todas as três curvas testadas no experimento foram eficientes na congelabilidade de sêmen equino em relação aos parâmetros espermáticos, motilidade e integridade da membrana. Sendo que a máquina de congelamento TK3000® foi tão eficaz quanto à metodologia de congelação em caixa de isopor (De Vita, 2008).

2.5. Principais crioprotetores utilizados no congelamento de sêmen equino

Em experimento MEDEIROS (2003) objetivou testar diferentes formas de amidas como agentes crioprotetores em comparação ao glicerol a 5%. Os tratamentos de crioprotetores foram divididos em: DA1- dimetilacetamida a 1% (v/v), DA3-dimetilacetamida a 3% (v/v), DA5-dimetilacetamida a 5%, MF5- metilformamida a 5% (v/v), DF5-dimetilformamida a 5% (v/v) e GL5- glicerol a 5%. O agente crioprotetor glicerol foi inferior a todos os derivados de amidas, no sentido de proteger os espermatozoides de danos contra os danos do congelamento e descongelamento, e dentre as amidas estudadas a dimetilformamida foi a mais eficiente em crioprotetor os espermatozoides de danos.

Já Juliani e Henry (2008) utilizando 24 ejaculados de garanhões para testar os efeitos de um diluidor a base de gema de ovo associado com diferentes concentrações dos crioprotetores glicerol, etilenoglicol, acetamida e leite desnatado. Observaram que o tratamento contendo apenas glicerol apresentou os maiores valores de motilidade total e progressiva, já os diluentes contendo leite em composição apresentaram maiores valores de integridade funcional e estrutural da membrana. Concluindo que as modificações incorporadas aos meios diluidores testados não resultaram em melhor efeito crioprotetor que o meio à base de glicerol 5% no congelamento do sêmen equino.

Outro estudo da viabilidade do sêmen de garanhões no pré e pós congelamento utilizando glicerol e metilformamida, propôs que quando utilizados em concentrações usuais os mesmos não causam nenhum efeito deletério durante o processo de refrigeração, e ainda foram eficientes em proteger as células espermáticas dos danos do congelamento nas concentrações 2,3, e 4,5%, com melhores resultados para metilformamida comparados com glicerol (Ferreira, 2008).

Utilizando duas curvas de congelamento e dois diluentes comerciais, maior eficiência na criopreservação de sêmen equino foram encontradas utilizando a curva automatizada e um diluente que continha em sua composição açúcares, aminoácidos, gema de ovo, glicerol e metilformamida, quando comparado ao diluente composto por leite desnatado e gema de ovo, com glicerol como crioprotetor e que não continha amidas em sua formação.

Resultados que indicam a adoção de diluentes contendo amidas como crioprotetor obtiveram melhores resultados segundo Terraciano et al. (2008).

Ao inseminar 104 éguas, divididas em dois experimentos, para avaliar a fertilidade do sêmen congelado de garanhões da raça Crioula (n=5), com 5% de dimetilformamida ou 5% de glicerol, como crioprotetores. A utilização da dimetilformamida para criopreservação do sêmen de garanhões da raça Crioula resultou em motilidade pós-descongelamento superior e maiores

índices de prenhes, quando comparada com a utilização do glicerol, em protocolos de inseminação 6h pós-inseminação. Segundo estudos realizados por Oliveira et al. (2013b).

Equinos das raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador foram avaliados por Costa et al. (2014) utilizando dois diluentes a base de gema de ovo e glicerol, contendo ou não metilformamida e sua composição. Sendo que o que continha metilformamida apresentou melhores resultados quanto aos valores de motilidade e vigor e a integridade de membrana plasmática, pós-congelamento. Também não apresentaram diferenças entre as raças quanto motilidade total e vigor do sêmen fresco, bem como para essas análises no teste de termoresistência pós-congelamento. No entanto os ganhos da raça Quarto de Milha apresentaram maior percentual de defeitos maiores na análise de patologia espermática, comprovando assim, a grande variação observada entre indivíduos da espécie equina, na habilidade dos espermatozoides sobreviverem ao processo de congelamento.

Características de motilidade total, vigor e integridade de membrana plasmática e acrossomal avaliadas no pós-descongelamento dos espermatozoides de ganhos da raça Mangalarga Marchador (n=5), foram avaliadas empregando três diluentes (1% de glicerol e 4% de metilformamida; 5% de glicerol; e 2% de glicerol e 3% de dimetilformamida) de criopreservação. Para o sêmen de ganhos da raça Mangalarga Marchador, considerados de baixa congelabilidade, diluentes que combinam concentrações de glicerol de 1 ou 2%, com crioprotetores alternativos como a metilformamida e dimetilformamida, foram mais eficazes na proteção da célula espermática pós-descongelamento, quando comparados ao diluente contendo apenas o glicerol na concentração de 5% (Nascimento et al. 2015).

Avaliando as características do sêmen a fresco e descongelado de ganhos da raça Nordestina, Santos et al. (2015) descobriram que embora a criopreservação tenha provocado queda na motilidade seminal, o uso de diluidor contendo amidas minimizou os danos osmóticos nas células espermáticas e manteve a integridade morfológica, funcional e estrutural da membrana plasmática do espermatozoide.

Existe a necessidade de realização de mais experimentos referentes à composição dos meios de congelamento, por não existir consenso sobre o diluidor mais eficiente na preservação da viabilidade espermática para a maioria dos ganhos. No entanto Snoeck et al. (2007) também destacaram que tanto a composição dos diluidores de congelamento de sêmen quanto ao envase utilizado, também são fatores que podem afetar os resultados da criopreservação.

3. Considerações Finais

A criopreservação de sêmen na espécie equina vem crescendo devido a possibilidade de armazenamento do material genético de ganhos por longo período de tempo, conseguindo assim melhor aproveitamento genético de animais de grandes valores econômicos e zootécnicos.

Considerando a baixa eficiência do processo de criopreservação equina, quando comparado aos bovinos, que surgiram as necessidades de maiores conhecimentos em relação aos efeitos deletérios causados aos espermatozoides pelos crioprotetores, diversos estudos têm sido realizados no intuito de avaliar crioprotetores para congelamento de sêmen equino, com intuito de comparar as ações dos meios crioprotetores já utilizados, bem como descobrir novos meios.

Para o sucesso no processo de criopreservação em equinos, considerando as grandes variações de resistência aos danos causados pelo processo entre os indivíduos da espécie, é de grande importância ressaltar os diferentes tipos de protocolos de crioprotetores, diluidores e curvas de congelamento utilizados, para que se adequar cada protocolo para cada indivíduo.

Em tentativas de aprimoramento desta técnica estudos vem sendo desenvolvidos em busca de diferentes diluentes crioprotetores. Notoriamente os mais utilizados são o glicerol e a gema de ovo, no entanto novos estudos com amidas têm obtido resultados bastante satisfatórios, com destaque para a dimetilformamida.

Referências bibliográficas

- ALVARENGA, M.A. et al. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using packaging systems. **Equine Veterinary Journal**, v.6, p.541-545, 2000.
- ALVARENGA, M.A. et al. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.105-113, 2005.
- AMANN RP, PICKETT BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.
- ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; ALENCAR, M.M.; BARNABE, R.C. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lente e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Braslian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 1, p. 131- 137, 1992.
- ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. Dissertação (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade São Paulo, São Paulo, SP, 2000.
- ARRUDA, R. P. et al. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte v.31, n.1, p.8-16, jan./mar. 2007.
- AX, R. L.; DALLY, M. R.; DIDIDON, B. A.; LENZ R. W.; LOVE, C. C., VARNER, D. D.; HAFEZ, B. e BELLIN, M. E. **Avaliação do Sêmen e Inseminação Artificial** In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7 Ed. São Paulo: Manole, 2004. Cap. 25 e 26.
- BALL, B. A. e VO A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061, 2001.
- BAUDOT A, BOUTRON P. Glass-forming tendency and stability of aqueous solutions of dietilformamide and dimetilformamide. **Cryobiology**, v.37, p.187-199, 1998.
- BERBER, Rodolfo Cassimiro de Araújo. **Coleta e Processamento de Sêmen Bovino**. Online. Disponível em: <<http://globalgenetics.blogspot.com.br/p/artigos.html>> Acessado em: 18 de agosto de 2016.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Equídeos**. Online. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>> Acessado em: 19 de agosto de 2016.
- CANDEIAS, M. L. **Avaliação de diferentes protocolos de criopreservação de sêmen de garanhões da raça Mangalarga marchador**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Fluminense, Niterói-RJ, 2010.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2ª Ed. Belo horizonte, 1998. 49p.
- CLULOW et al. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. **Australian Veterinarian Journal**. 2007 Jun; v. 85 n. 6, p.232-235, 200
- COSTA, D. N. M. et al. 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.
- DE VITA, Bruna. **Estudo de diferentes sistemas e curvas de congelamento na eficiência da congelabilidade e fertilidade de sêmen equino**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.
- DE VITA, Bruna et al. Utilização de sistemas de refrigeração de sêmen equino na estabilização das amostras seminais previamente à congelamento. **Ciência Animal Brasileira**, [S.l.], v. 12, n.

- 1, p. 120 - 125, mar. 2011. ISSN 1809-6891. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/4098/8906>>. Acesso em: 22 de agosto de 2016.
- DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.A. field study of the fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v. 22, p. 291 - 303, 1984.
- FARIAS, Deise Keli. **Protocolo superovulatório com extrato de pituitária equina (epe) em éguas da raça Crioula e Quarto de milha**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) CAV- UDESC, Lages - SC, 2013.
- FERREIRA, H. N. **Efeito da exposição aos crioprotetores glicerol e metilformamida sobre a viabilidade e fertilidade do sêmen equino**. Dissertação de mestrado. UNESP – Botucatu, SP. 2008.
- FREITAS, M. L. **Centrifugação com leite desnatado para criopreservação do sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador**. Artigo de Monografia – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013
- GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS, A.S.L.; PAPA, F.O., ALVARENGA, M.A. Improvement of stallion spermatozoa for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, p. 277-279, 2002.
- GONÇALVES, N. M. e NEVES, M. M. **Sêmen fresco, resfriado ou congelado: existe diferença entre ele?** Online. Disponível em: <<https://www2.cead.ufv.br/espacoProdutor/scripts/verArtigo.php?codigo=27&acao=exibir>>_Acessado em: 22 de agosto de 2016.
- HAFEZ, E. S. E. **Preservação e Criopreservação de gametas e embriões** In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7 Ed. São Paulo: Manole, 2004. Cap. 30
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. In: _____ 7 Ed. São Paulo: Manole, 2004. 513p.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p. 3-22, 2000.
- JULIANI, G. C. e HENRY, M. Efeito do glicerol, etilenoglicol, acetamida e leite desnatado na criopreservação de espermatozoides equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.5, p.1103-1109, 2008.
- KUNDU CN, CHAKRABORTY J, DUTTA P, BHATTACHARYYA D, GHOSH A, MAJUMDER GC. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemical defined medium and the goat caudal epididymal spermatozoa. **Cryobiology**, v.4, p.117-125, 2000.
- LAGARES, M. A.; MEIRELLES, L. S.; WALD, V. B.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Efeito de diferentes diluidores sobre a membrana plasmática do espermatozoide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 153-156, set./dez. 2000.
- LINDEN, L. S. **Criopreservação de sêmen equino: comparação da gema de ovo de em (*Rhea americana*) com a gema de ovo de galinha**. Dissertação (Mestre em Medicina Animal: Equinos) Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- MARTINS, Marlon Scherri. **Reprodução, Reprodução de Equinos**. TCC. Instituto de Pós Graduação Qualittas, Piracicaba-SP, 2011.
- MEDEIROS, A. S. L. **Utilização de vários tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhão**. 2003. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP: 2003.
- NASCIMENTO, J. N.; BLUME, H.; OLIVEIRA, F. J. G.; OLIVEIRA, R. A. Utilização de diferentes diluentes na criopreservação de espermatozoides de garanhões Mangalarga marchador. **Ciência Animal Brasileira** v.16, n.3, p.324-330, jul./set. 2015.

NUNES, D. B.; ZUCCART, C. E. S. N. e SILVA, E. V. C. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.30, n.1/2, p.42-56, jan./jun. 2006.

OLIVEIRA, R.A. Criopreservação de sêmen equino, um desafio a ser vencido. **PUBVET**, Londrina, V. 7, N. 26, Ed. 249, Art. 1647, Suplemento 2, 2013.

OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, B; M. M.; CELEGHINI, E. C. C.; FERNANDES, C. B.; MATTOS, C. B. Criopreservação do sêmen equino: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.1, p.23-28, jan./mar. 2013a.

OLIVEIRA, R. A.; RUBIN, M. I. B.; SILVA, C. A. M. Índice de prenhes com sêmen congelado de garanhões da raça crioula usando glicerol ou dimetilformamida como crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 488-494, dez. 2013b.

PEGG, D. E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.20, n.1, p.05- 14, 2002.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225, 2006.

RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas de espermatozoide equino refrigerado.** Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007.

SANTOS, M. A. et al. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. vol.35 no.11 Rio de Janeiro Nov. 2015.

SNOECK, P. P. N.; HENRY, M.; MELO, M. I. V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.59, n.1, p.56-64, 2007.

SOARES, A. T. e GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.3, n.2, p.53-63, jun. 2009.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.;

BRUEMMER, J. **Cooled and frozen Stallion Semen.** Fort Collins: Colorado State University. 1999, 80 p. (Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Bulletin, N. 9).

TERRACIANO, P. B. et al. Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. Artigo dissertação de mestrado. **Revista Ciência Rural** – Universidade Estadual de Santa Maria, 2008.

VIDAMENT, M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.115-136, 2005.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

YILDIZ C, KAYA A, AKSOY M, TEKELI T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**. V.54 p.579-85. 2000.

ZIMMERMANN, M. F.; FARINASSO, A.; MELO, C. M.; PAPA, F. O.; NEVES, J. P. Sobrevida das células espermáticas equinas criopreservadas após descongelamento e diluição utilizando-se dois diluentes comerciais. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 238-245, jan./mar. 2009.

Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. E e-mail de contato: camilacometa@hotmail.com

2. Docente do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. E e-mail de contato: klaytosantos@gmail.com

3. Docente do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. E e-mail de contato: aracele.pinheiro@yahoo.com.br

4. Docente do curso de Zootecnia. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. E e-mail de contato: rafael.ferro@ueg.br

5. Docente do curso de Zootecnia. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. E e-mail de contato: diogo.ferro@ueg.br

6. Mestranda do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. E e-mail de contato: raiany_soares@hotmail.com

7. Mestranda do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Estadual de Goiás, São Luís de Montes Belos, Goiás, Brasil. E e-mail de contato: Jaqueline.ferreira1@yahoo.com.br

Revista ESPACIOS. ISSN 0798 1015
Vol. 38 (Nº 42) Año 2017
Indexada en Scopus, Google Schollar

[Índice]

[En caso de encontrar algún error en este website favor enviar email a webmaster]

©2017. revistaESPACIOS.com • Derechos Reservados