UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JULIANA NASCIMENTO

Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides eqüinos criopreservados

Pirassununga
2006

JULIANA NASCIMENTO

Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides eqüinos criopreservados

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre.

Pós-graduação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Área de Concentração:

Qualidade e Produtividade Animal

Orientador:

Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda

Pirassununga
2006

FICHA CATALOGRÁFICA
preparada pela
Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

N244e

Nascimento, Juliana
Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia de epifluorescência) de espermatozóides eqüinos criopreservados Juliana Nascimento – Pirassununga, 2006.
107 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo.
Departamento de Zootecnia.
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.
Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

Unitermos: 1. Eqüino 2. Espermatozóides 3. Criopreservação 4. Concentração 5. Volume I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Nascimento
Reprodução de eqüinos

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____Assinatura: _____

À minha mãe ***Ana Alcina Nascimento***, que nunca mediu esforços para me proporcionar o melhor estudo e que sempre apoiou minhas decisões.

À minha tia, ***Beatriz Ramos Nascimento***, que sempre foi o alicerce da minha família e da minha vida, mas sem perder a ternura.

Ao meu noivo, ***Maurício José Bittar***, meu exemplo e estimulador da profissão de medicina veterinária eqüina, companheiro, amigo e amor.

Dedico, com muito amor e carinho!

AGRADECIMENTOS

Ao ***Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda***, agradeço toda a dedicação e profissionalismo, como educador e orientador, e todo o carinho, como amigo, dedicados a mim.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos, “irmãos” e colegas de laboratório ***André Cesar Furugem de Andrade*** e ***Cláudia Fernandes Raphael***, que me acompanharam durante todo o meu mestrado e ajudaram na realização deste experimento.

À minha amiga e “professora” ***Drª Eneiva Carla Carvalho Celeghini*** pela amizade, paciência e ensinamentos laboratoriais.

Aos colegas pós-graduandos e companheiros de casa do VRA ***Zé Rodrigo, Drª Karen Peres, Vagner, Patrícia, Norma, Pauline, Gutinho, Alexandre, Vanessa, Drª Cláudia Bertan, André Granito, Marcelo, André Freire, Fernando Pardo, Filipe e Fernandinho*** por todo apoio, amizade e respeito.

A todos os estagiários e graduandos da FMVZ-USP que, de alguma forma, ajudaram na elaboração da minha dissertação, em especial a ***Lucas Bianconi, Thaís e Neto***, que participaram diretamente durante a fase experimental.

Ao professor ***Dr Rogério Chaves Vieira***, da Universidade Federal de Uberlândia, pelos primeiros ensinamentos sobre reprodução eqüina e pela indireta ajuda no meu ingresso à pós-graduação da Universidade de São Paulo.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal da USP ***Dr. Ed Hoffmann Madureira, Dr Mário Binelli, Drª Anneliese de Souza Traldi, Dr José Antônio Visintin, Dr Pietro Sampaio Basurelli*** e ***Drª Mayra Helena Ortiz D´Avila Assumpção*** pela excelente convivência e pelos ensinamentos sobre a reprodução animal.

Ao professor do Departamento de Nutrição Animal da USP ***Dr. Paulo Henrique Mazza Rodriguez*** pelos ensinamentos e auxílio sobre estatística.

Aos funcionários do CBRA da USP-Pirassununga ***Bel, Creusa, Márcio e Zé*** pela presteza e respeito ao meu trabalho.

Aos funcionários do Setor de Eqüideocultura da Prefeitura do Campus Administrativo da USP–Pirassununga ***Valdir, Maico e Sr. Jorge***, pelo carinho e dedicação aos animais e pelo respeito ao meu trabalho.

A secretária da pós-graduação da FZEA-USP ***Maria Conceição Roldão***, sempre muito prestativa, educada e eficiente em atender minhas necessidades e dúvidas burocráticas.

A todos os meus familiares e aos do meu noivo, que em silêncio torceram para terminasse meu mestrado com sucesso.

Agradeço de coração!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	micrograma
μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micrômetro
Δψm	potencial de membrana mitocondrial
ΔpH	gradiente de próton de hidrogênio
ADP	adenosinadifosfato
Acro	defeito de acrossoma
ALH	amplitude lateral da cabeça
ANOVA	análise de variância
APM	alto potencial de membrana mitocondrial
ASMA	avaliação automatizada da morfometria espermática
ATP	adenosinatrifosfato
BaEst	base da cabeça espermática estreita
BCF	freqüência de batimentos
C100	100 milhões de espermatozóides por mililitro
C200	200 milhões de espermatozóides por mililitro
C400	400 milhões de espermatozóides por mililitro
Ca^{2+}	íon cálcio
CASA	Computer-Assisted Semen Analisys – Análise Computadorizada do Sêmen
CDE	cauda espermática dobrada ou enrolada
CDGPD	cauda espermática dobrada com gota protoplasmática distal anexa

CEC	cauda espermática enrolada na cabeça
CFDA	diacetato de carboxifluoresceína
CFDE	cauda espermática fortemente dobrada ou enrolada
CGCLP	cabeça espermática gigante, curta, larga ou pequena normal
CIN	cabeça espermática isolada normal
CIP	cabeça espermática isolada patológica
CMXRos	cloreto de 8-(4`-clorometil) fenil-2,3,5,6,11,12,14,15 octahidro-1H,4H,10H,13H-diquinolizino-8H-xantilio (MitoTracker red®)
CO_2	gás carbônico
CoA	coenzima A
CoAn	cabeça espermática de contorno anormal
GPD	gota protoplasmática distal
Csub	cabeça espermática subdesenvolvida
DIC	contraste de interferência e diferencial
DM	total de defeitos espermáticos maiores
Dmen	total de defeitos espermáticos menores
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPBS	solução tamponada salina de Dulbecco
e^-	elétron
$FADH_2$	flavina adenina dinucleotídeo reduzido
FITC	isotiocianato de fluoresceína
g	grama
g	gravidade
GPP	gota protoplasmática proximal

H^+	íon de hidrogênio
H258	Hoechst 33258
H_2O	molécula de água
H342	Hoechst 33342
Hz	Hertz
Interm	defeito de peça intermediária do espermatozóide
JC-1	Iodeto de 5,5’,6,6’-tetracloro-1,1,3,3’-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
kDa	quilodalton
LIN	linearidade
MAI	membrana acrossomal intacta
MPI	membrana palsmática intacta
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MTCA	motilidade total pelo CASA
MPRO	motilidade progressiva pelo CASA
mV	milivolt
nm	nanômetro
NADH	nicotina adenina dinucleotídeo
NRC	National Reseach Concil
NH_3	amônia
O_2	gás oxigênio
OH^-	hidroxila

P	nível de significância
PeAn	cabeça espermática pequena e anormal
pH	concentração de íons de Hidrogênio
Pi	fósforo inorgânico
PI	iodeto de propídio
PIAIA	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Intacto e Com Alto Potencial de Membrana Mitocondrial
PIAIB	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Intacto e Com Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial
PIALA	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Com Alto Potencial de Membrana Mitocondrial
PIALB	Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Com Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial
Piri	cabeça espermática de formato piriforme
PLAIA	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Com Alto Potencial de Membrana Mitocondrial
PLAIB	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Com Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial
PLALA	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Com Alto Potencial de Membrana Mitocondrial
PLALB	Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Com Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial
Pouch	*Pouch Formation*
PSA	aglutinina de *Pisum sativum*

r	coeficiente de correlação
R123	Rodamina 123
Retro	inserção retroaxial ou oblíqua da cauda espermática
s	segundos
SAS	Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)
SNK	Student-Newman-Keuls
sptz	espermatozóides
STR	retilinearidade
TALP	meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato
TD	total de defeitos espermáticos
Terato	formas espermáticas teratológicas
VAP	velocidade do trajeto
VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

^{o}C	graus Celsius
%	percentagem
x	vezes
10^6	milhões
<	menor que
>	maior que
±	mais ou menos
-	menos / negativo
=	igual
®	marca registrada
:	para (1:100)
mOsm	miliosmol

RESUMO

NASCIMENTO, J. Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia de epifluorescência) de espermatozóides eqüinos criopreservados. [Effects of spermatic concentration and volume in motion characteristics (CASA) and plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes (epifluorescence microscopy) of equine cryopreserved spermatozoa]. 2006. 107 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

É sabido das vantagens da utilização do sêmen criopreservado na reprodução eqüina, mas também é de conhecimento que o entendimento desta biotecnologia ainda é carente. Não se tem concordância quanto à dose e concentração espermáticas ideais para se obter bons resultados de fertilidade. Assim, este experimento teve o intuito de avaliar o movimento espermático pelo sistema computadorizado (CASA), a morfologia espermática, além da integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial, com sondas fluorescentes, em espermatozóides eqüinos criopreservados nas concentrações de 100, 200, e $400x10^6$sptz/mL e nos volumes 0,50 e 0,25mL. Foram utilizados quatro garanhões sendo oito colheitas de cada animal, através de vagina artificial. Após a colheita, o sêmen foi diluído em extensor à base de leite desnatado (1:1), centrifugado 500xg por 10 minutos, o sobrenadante retirado, e o pellet ressuspendido em diluidor Botu-Crio® nas concentrações de 100 (C100), 200 (C200) e $400x10^6$sptz./mL (C400). Em seguida, envasado em palhetas de 0,50 e 0,25mL. Para criopreservação do sêmen utilizou–se aparelho automatizado (TK3000®), com curvas de resfriamento -0,25ºC/min e de congelação -15ºC/min até -80ºC e -10ºC/min, até atingir -120ºC, quando as palhetas foram mergulhadas em N_2 líquido (-196 ºC) e armazenadas em botijões criogênicos. Foram descongeladas duas palhetas de cada tratamento em banho-maria (37ºC por 30s). Uma amostra do sêmen foi diluída em formol salino para avaliação da morfologia espermática e outra em TALP *sperm* à concentração de $25x10^6$sptz/mL. Logo após, uma amostra desta solução foi submetida à análise computadorizada do movimento espermático. As características analisadas foram: motilidade total (MTCA, %), motilidade progressiva (MPRO, %), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), deslocamento lateral de cabeça (ALH, µm) e freqüência de batimento flagelar (BCF, Hz). Em seguida, uma outra amostra foi avaliada quanto à integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial, utilizando PI, JC-1 e FITC-PSA, por microscopia de epifluorescência. Foram determinados os percentuais de espermatozóides com membranas plasmáticas intactas (MPI), acrossomais intactas (MAI) e mitocondriais de alto potencial (APM) e membranas plasmática e acrossomal intactas e com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA). Foi utilizada análise de variância (ANOVA) ($p<0,05$) e teste de médias SNK ($p<0,05$), pelo método SAS®. Não houve efeito da interação entre volume da palheta e concentração espermática para as características estudadas. As características do movimento espermático foram influenciadas pela concentração, de forma que C100>C200>C400, exceto em LIN e STR. O volume somente alterou os valores de STR e VCL. Quanto à integridade e funcionalidade das membranas, não houve efeito do volume, enquanto que as concentrações alteraram somente MPI (C100>C200>C400) e APM (C100=C200>C400). Na morfologia espermática, a concentração somente afetou a percentagem de cauda dobra ou enrolada (C100>C200=C400) e o volume de armazenamento somente as quantidades de cabeça isolada normal e patológica (0,50>0,25mL). Assim, o melhor método de congelação, neste experimento, foi em C100,

seguido por C200 e por último C400, em ambos os volumes. Portanto, a qualidade seminal pós-descongelação está diretamente relacionada com a quantidade de agentes crioprotetores por unidade celular, independente do volume da palheta.

Palavras-chave: Eqüino. Espermatozóides. Criopreservação. Concentração. Volume.

ABSTRACT

NASCIMENTO, J. Effects of spermatic concentration and volume in motion characteristics (CASA) and plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes (epifluorescence microscopy) of equine cryopreserved spermatozoa. [Efeitos da concentração espermática e volume sobre as características do movimento espermático (CASA) e sobre membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial (microscopia de epifluorescência) de espermatozóides eqüinos criopreservados]. 2006. 107 f. Dissertação. (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

It has been known the advantages of cryopreserved semen utilization in equine reproduction, but the understanding of this biotechnology is uncertain yet. There was not agreement of the ideal spermatic dose and concentration to optimize fertility results. Thus this experiment had the objective to evaluate spermatic motion by computed analysis (CASA), spermatic morphology and the plasmatic and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential with fluorescence probes of equine cryopreserved spermatozoa on 100, 200 and $400x10^6$sptz/mL concentrations and 0.50 and 0.25mL volumes. Eight ejaculates from four stallions were collected in artificial vagina. The semen was diluted in skim-milk extender (1:1), centrifuged at 500xg for ten minutes, the supernatant was removed and the freezing extender Botu-Crio® was added in the pellet to a final concentrations of 100 (C100), 200 (C200) and $400x10^6$sptz/mL (C400); after that, it was packed in 0.50 and 0.25mL straws. The cryopreservation of semen utilized an automatic system (TK3000®), with cooling slope -0.25°C/minute and freezing slope of -15°C/minute, until -80°C, and -10°C/minute, until -120°C, when the straws were plunged into liquid nitrogen (-196°C), and stored in cryogenics tank. They were thawed for 30s in a 37°C waterbath. A sample of semen was diluted in saline formol to morphology spermatic evaluation and another diluted in TALP sperm at $25x10^6$sptz/mL. After, a sample was submitted to CASA evaluation. The analyzed characteristics were: total motility (TMCA, %), progressive motility (PROM, %), progressive velocity (VSL, µm/s), track speed (VCL, µm/s), beat cross frequency (BCF, Hz) and lateral amplitude of head (ALH, µm). Afterward, another sample was evaluated about plasmatic and acrosomal membranes integrity and mitochondrial potential membrane, using PI, JC-1 and FITC-PSA by epifluorescence microscope. It was determined the spermatozoa percentage with intact plasmatic membranes (IPM), intact acrosomal membranes (IAM), and high potential mitochondrial membrane (HPM) and intact plasmatic and acrosomal membranes and with high potential mitochondrial membrane (IPIAH). For statistical analysis were utilized variance analysis (ANOVA - $p<0.05$) and SNK test ($p<0.05$) with standard deviation, by SAS® system. There was not effect of straw volume and spermatic concentration interaction in the studied characteristics. The spermatic motion characteristics were influenced by concentration (C100>C200>C400), except LIN and STR. The volume changed the values of percentage of STR e VCL. In membrane integrity and functionality there was no volume effect, however the concentrations changed only IPM C100>C200>C400) e HPM (C100=C200>C400). In spermatic morphology, the concentration affected the percent of folded or coiled tail (C100>C200=C400) and the volume only affected the loose normal and abnormal head (0.50>0.25mL). Thus, the better freezing method, in this experiment, was C100, followed by C200, and C400, in both straws volumes. The seminal quality post-thawed is related with the cryoprotector quantity by cell, free of the straw volume.

Key-words: Equine. Spermatozoa. Cryopreservation. Concentration. Volume.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20

2.REVISÃO DE LITERATURA 25

2.1. A célula espermática 26

2.1.1. Membrana Plasmática 27

2.1.2. Acrossomo 29

2.1.3. Mitocôndria 30

2.2. Crioinjúrias espermáticas 32

2.3. Concentração e volume de armazenamento do sêmen criopreservado 36

2.4. Associação de sondas fluorescentes para avaliação da integridade das membranas acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial 39

3. MATERIAIS E MÉTODOS 43

3.1. Local e Período 44

3.2. Animais 44

3.3. Colheita do sêmen 44

3.4. Avaliações do sêmen pré-congelação 45

3.4.1. Volume 45

3.4.2. Motilidade Total Visual e Vigor 45

3.4.3. Concentração Espermática 46

3.4.4. Avaliação Computadorizada das Características do Movimento Espermático (*Computer Assisted Semen Analysis* - CASA) 46

3.4.5. Avaliação das Membranas Plasmática, Acrossomal e Mitocondrial 47

3.4.6. Avaliação das Características Morfológicas 50

3.5. Preparação e Criopreservação do Sêmen 50

3.5.1. Centrifugação 50

3.5.2. Avaliação da concentração espermática do sedimento celular 51

3.5.3. Ressuspensão do sedimento espermático 51

3.5.4. Envase do sêmen 52

3.5.5. Criopreservação do sêmen 52

3.6. Descongelação do sêmen 53

3.7. Avaliações do sêmen pós-descongelação 55

3.7.1. Avaliação computadorizada de características do movimento espermático (CASA) 55
3.7.2. Avaliação da integidade das membranas plasmática acrossomal e potencial de membrana mitocondrial 55
3.7.3. Avaliação das Características Morfológicas 56
3.7.4. Análise Estatística 57

4. RESULTADOS 58
4.1. Avaliações pré-congelação 59
Média Total 62
Garanhão 63
4.2. Avaliações pós-descongelação 64
4.2.1.2. Avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA) 65
4.2.1.3. Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial 66
4.2.1.4. Avaliação das Características Morfológicas 68
4.2.2. Efeito do volume da palheta 71
4.2.2.1. Avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA) 71
4.2.2.3. Avaliação das Membranas Plasmática, Acrossomal e Mitocondrial 73
4.2.2.4. Avaliação das Características Morfológicas 75

5. DISCUSSÃO 79

6. CONCLUSÕES 90

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 92

8. ANEXOS 103
ANEXO 1 104
TALP *sperm* (BAVISTER et al., 1983) 104
ANEXO 2 106
DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES 106
ANEXO 3 107
SETUP – HAMILTON THORNE BIOSCIENCES (Ultimate – Sperm Analyzer) 107

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 (aumento 1.000 x). ***A****. Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA).* ***B****. Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com baixo potencial de membrana mitocondrial (PIAIB).* ***C****. Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial (PLAIA).* ***D****. Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com alto potencial de membrana mitocondrial (PLALA).* ***E****. Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com baixo potencial de membrana mitocondrial(PLAIB).* ***F****. Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com baixo potencial de membrana mitocondrial (PLALB) - Pirassununga -2006.....49*

Figura 2 - Esquema simplificado do processamento do sêmen para criopreservação.....54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação das células em categorias de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, detectadas pelas sondas PI, FITC-PSA e JC-1, respectivamente, Pirassununga - 2006.....48

Quadro 2 - Quadro de análise de variância para delineamento em blocos, com 2 tratamentos – Pirassununga, 2006......57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias ± desvios padrão do volume (free gel), concentração, motilidade visual (MTV) e vigor espermáticos do sêmen in natura de cada garanhão - Pirassununga –2005…59

Tabela 2 - Médias ± desvios padrão das características do movimento espermático do sêmen eqüino (in natura), avaliados pelo sistema CASA - Pirassununga –2005. 61

Tabela 3 - Médias ± desvios padrão das percentagens de células espermáticas, classificadas de acordo com os resultados da microscopia de epifluorescência, do sêmen (in natura) dos garanhões em oito colheitas de sêmen - Pirassununga –2005.....62

Tabela 4 - Médias ± desvios padrão das percentagens de alterações morfológicas no sêmen in natura dos garanhões, em oito colheitas de sêmen - Pirassununga –2005. 63

Tabela 5 - Médias ± desvios padrão das características do movimento espermático avaliados pelo sistema CASA de sêmen eqüino congelado em três diferentes concentrações espermáticas - Pirassununga –2005. 65

Tabela 6 - Médias ± desvios padrão das percentagens de células espermáticas, classificadas de acordo com os resultados da microscopia de epifluorescência de sêmen congelado eqüino, em três diferentes concentrações espermáticas – Pirassununga – 2005. 67

Tabela 7 - Médias ± desvios padrão das percentagens de alterações morfológicas do sêmen eqüino congelado em três diferentes concentrações espermáticas – Pirassununga – 2005….69

Tabela 8 - Médias ± desvios padrão das características do movimento espermático avaliados pelo sistema CASA de sêmen eqüino congelado em palhetas francesas de 0,50 mL e 0,25 mL - Pirassununga –2005.....72

Tabela 9 - Médias ± desvios padrão das percentagens de células espermáticas, classificadas de acordo com os resultados da microscopia de epifluorescência de sêmen eqüino congelado em palhetas francesas de 0,50 e 0,25 mL – Pirassununga – 2005.....74

Tabela 10 - Médias ± desvios padrão das percentagens de alterações morfológicas do sêmen eqüino congelado em palhetas francesas de 0,50 e 0,25 mL – Pirassununga – 2005. 76

1. INTRODUÇÃO

É notória a importância da criopreservação do sêmen eqüino no melhoramento da espécie nos dias atuais, no qual a velocidade de informações e produtividade são requisitos para o sucesso nos setores econômicos. Por isso, a utilização de sêmen congelado na eqüinocultura assumiu grande importância e extensão nas últimas décadas, possibilitando o transporte e armazenamento de material genético de garanhões por longos períodos, o seguro biológico, a racionalização do uso do garanhão nas estações de monta, o aumento da relação égua/garanhão e o controle de doenças. Todos esses benefícios advindos da utilização do sêmen congelado proporcionam maior aproveitamento de animais de grande valor econômico e zootécnico.

No entanto, sabe-se também que as inseminações artificiais utilizando sêmen criopreservado ainda resultam em menores taxas de fertilidade, quando comparadas aos resultados de sêmen a fresco ou resfriado (MARSHBURN, 1992; SAMPER; MORRIS, 1998; WATSON, 2000). Isto porque o processo de criopreservação do sêmen possui fatores potencialmente prejudiciais ao espermatozóide (BLACH et al, 1989; WATSON, 2000). Ainda, o sucesso da inseminação artificial com sêmen congelado requer um número adequado de espermatozóides na dose inseminante, sendo a dose mais utilizada de 400 a 800 x 10^6espermatozóides totais (SQUIRES, 2005), depositados na região do corpo uterino, necessitando, normalmente, o uso de 5 a 8 palhetas descongeladas por inseminação.

Sendo assim, no intuito de maximizar a utilização do sêmen eqüino congelado e diminuir os danos causados pelo processo de criopreservação, melhorando assim as taxas de fertilidade, vários protocolos são desenvolvidos e testados, como a combinação de diferentes volumes de armazenamento e diferentes concentrações espermáticas. Apesar de muitas pesquisas procurarem a melhor combinação de ambos, ainda não se tem ao certo o melhor protocolo para a criopreservação do sêmen. No entanto, espera-se que menores volumes tendem a proporcionar maior superfície de contato com o meio externo, o que permite maior

uniformidade entre as células durante os processos de resfriamento, congelação e descongelação; enquanto que menores concentrações espermáticas tendem a manter maior número de células viáveis, pois possuem maior quantidade de nutrientes por célula. É possível que ocorra interações entre a concentração espermática e o volume de armazenamento ou mesmo um efeito compensatório do aumento da concentração na diminuição do volume.

Portanto, seria de grande importância conhecer a possibilidade de se congelar células espermáticas eqüinas em maior concentração, mesmo que em menor volume, para melhorar a qualidade seminal pós-descongelação, facilitando assim a utilização de menor número de palhetas por inseminação artificial.

Aumentando a importância deste conhecimento, a necessidade de alta produtividade levou os profissionais da área a procurar maneiras de maximizar ainda mais a utilização do material genético de grandes reprodutores, sendo desenvolvidas técnicas na qual utilizam-se baixas doses inseminantes, seja pelo desvio da pipeta para o corno ipsilateral ao folículo pré-ovulatório (BUCHANAN et al., 2000; LINDSEY et al., 2001; PETERSEN et al., 2002), ou pela histeroscopia, depositando o sêmen na papila tubárica ipsilateral ao folículo pré-ovulatório (ALVARENGA et al., 2001; BRINSKO et al., 2003; MANNING et al., 1998;VAZQUEZ et al., 1998), o que pode implicar na utilização de somente uma única palheta durante a inseminação.

Simultaneamente, a biotecnologia do sêmen sexado, já difundida na espécie bovina, começa ganhar atenção dentro da reprodução eqüina (LINDSEY et al, 2005; MEDINA, 2004; SUH et al., 2005); e, o processo de sexagem, resulta na congelação do sêmen em concentrações baixas e principalmente em palhetas de menor volume. Para estes casos, é importante conhecer a qualidade seminal pós-descongelação na combinação de baixo volume de armazenamento e baixa concentração espermática.

Para uma cuidadosa avaliação seminal, a ciência hoje possui técnicas laboratoriais precisas e modernas que auxiliam no conhecimento da célula espermática, como a avaliação das características do movimento espermático computadorizado (CASA), que apresenta dados de cinética espermática não mensuráveis ao olho humano. Entretanto, embora estas informações da cinética espermática sejam valiosas, não são sempre uma informação real do potencial de fertilidade do sêmen.

Neste caso, acredita-se que a integridade das membranas espermáticas seja crucial para a fertilização (GRONDAHL et al., 1994). Por este motivo, grande ênfase vem sendo dada ao uso das sondas fluorescentes, uma técnica de grande valor laboratorial por sua característica de marcar estruturas específicas das células e detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara, sendo possível avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal, juntamente com avaliação do potencial de membrana mitocondrial. Ressalta-se a inexistência de trabalhos que avaliem o comportamento simultâneo desses três componentes celulares pós-descongelação em decorrência de variações na concentração espermática e volume de armazenamento do sêmen eqüino criopreservado.

Sendo assim, este experimento teve como objetivo avaliar os resultados de congelação do sêmen eqüino, quando da utilização das concentrações espermáticas de 100, 200 e 400 x 10^6 espermatozóides/mL e dos volumes de armazenamento de 0,5 e 0,25 mL, avaliando características de movimento espermático por análise computadorizada (CASA), integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial e morfologia dos espermatozóides pós-descongelação.

A partir das idéias e objetivos deste trabalho descritos acima, tem-se as hipóteses de que:

i. As concentrações de 100, 200 e 400 x 10^6 espermatozóides/mL resultam em diferentes qualidades seminais pós-descongelação;

ii. Os volumes de 0,50 e 0,25 mL resultam em diferentes qualidades seminais pós-descongelação;

iii. Existe relação entre a concentração espermática e o volume de armazenamento na qualidade do sêmen eqüino pós-descongelado.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A célula espermática

O espermatozóide é uma célula alongada (GARNER; HAFEZ, 2004), formada por duas regiões altamente especializadas: a cabeça, na qual está contido o DNA e o acrossomo, vital para a interação espermatozóide-oócito e o flagelo, envolvido com a motilidade da célula; neste encontra-se a peça intermediária, contendo as mitocôndrias, relacionada com a produção de energia. A cabeça do espermatozóide, além do núcleo, contém pequena quantidade de citoplasma e, no seu extremo apical, o acrossomo, uma vesícula contendo enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração na zona pelúcida (YANAGIMACHI, 1994).

O núcleo é extremamente condensado e provavelmente contém pouca quantidade de água, restando como localização para este líquido os espaços entre as membranas plasmática e acrossomal externa ou dentro de estruturas como o acrossomo e a mitocôndria (AMANN; PICKETT, 1987).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóide para o oócito, onde a união dos pronúcleos masculino e feminino ocorre, produzindo o zigoto (EDDY; O’BRIEN, 1994). Desta forma, a função principal da cabeça do espermatozóide é a liberação de uma série haplóide de cromossomos para o oócito; enquanto, a do flagelo é promover motilidade à célula para permitir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e a penetração através da zona pelúcida do oócito (MORTIMER, 1997).

2.1.1. Membrana Plasmática

A membrana plasmática é formada por duas camadas lipídicas, contendo moléculas de fosfolipídeos polares, distribuídas assimetricamente, de propriedades anfipáticas, todas orientadas de maneira que a porção hidrofóbica fique direcionada para o centro da membrana e a porção hidrofílica para a superfície da membrana. Os principais lipídeos presentes nesta estrutura celular são fosfolipídeos, como colina, serina, glicerol e inositol, glicoesfingolipídeos e esteróides. As células espermáticas, na espécie equina, possuem uma composição incomum de organização de lipídeos na membrana plasmática. Esta é repleta de fosfolipídeos poliinsaturados que podem compensar perdas de colesterol. Os fosfolipídeos poliinsaturados são mais flexíveis que os saturados e podem, portanto, manter a dinâmica característica de bicamada lipídica desta membrana (FLESCH; GADELLA, 2000)

Estruturas protéicas também são encontradas, ancoradas ou associadas na membrana plasmática, desigualmente distribuídas entre diferentes regiões da cabeça e outras partes do espermatozóide (AGUAS; PINTO, 1983), atuando como bombas de cálcio, sódio e outros íons ou ainda como receptores associados a interações ao oócito durante o processo de fertilização (GRAHAM, 1996). Estas proteínas são estruturas covalentes unidas, termodinamicamente estáveis e metabolicamente ativas. A maioria das proteínas de membrana é componente integral, interagindo com os fosfolipídeos e freqüentemente globular e anfipática. Já as proteínas periféricas não interagem diretamente com os fosfolipídeos da bicamada, mas estão, ao invés disso, unidas através de ligações fracas nas regiões hidrofílicas das proteínas integrais específicas da membrana (MURRAY, 1994).

À temperatura corpórea, a membrana plasmática apresenta-se na forma de um mosaico fluído onde as proteínas estão livres para mover-se entre os fosfolipídeos bilaterais, uma vez

que a própria função requer que as proteínas estejam aptas para mover-se dentro da membrana (JASKO, 1994), o que a torna uma estrutura extremamente dinâmica (GADELLA et al., 2001).

Os principais fatores que afetam esta fluidez são sua composição relativa entre fosfolipídeos e colesterol e a temperatura à qual a membrana é exposta (HAMMERSTEDT et al., 1990). A manutenção do estado líquido dos lipídeos e das proteínas de membrana permite a movimentação livre dos componentes, o que garante suas interações (HAMMERSTEDT et al., 1990; FLESCH; GADELLA, 2000), ou seja, lipídeo-lipídeo, lipídeo-proteína. Essas interações são a base para ordenar os domínios na membrana, resultando na compartimentalização da membrana plasmática; e a manutenção desses domínios é essencial para a funcionalidade espermática (PARKS; GRAHAM, 1992).

A membrana plasmática dos espermatozóides de mamíferos tem uma pronunciada organização de domínios com muitos antígenos glicoprotéicos (WOLFE et al., 1998), sendo subdividida em domínios regionais bem delineados que diferem em composição e função.

Na cabeça do espermatozóide, a membrana plasmática possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-acrossomal. Na região acrossomal a membrana plasmática pode ser subdividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial. Os segmentos marginal e principal, juntos, são denominados de capa acrossomal. A membrana plasmática do flagelo é separada em domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial, e domínio da cauda posterior, que cobre as peças principal e terminal da cauda (EDDY; O’BRIEN, 1994).

A membrana plasmática da cabeça do espermatozóide é separada da membrana plasmática da peça intermediária pelo anel posterior, a qual é separada da membrana plasmática do flagelo pelo anel anular. Estes domínios diferentes contém concentrações e distribuições de partículas intra-membranosas variadas (FLESCH; GADELLA, 2000).

A diferenciação regional com seus domínios específicos, que compõe a superfície espermática, é correlata com funções especializadas. Assim, moléculas envolvidas na reação acrossômica estão presentes no acrossomo anterior, moléculas envolvidas na fusão do espermatozóide com o oócito estão presentes sobre o acrossomo posterior e moléculas envolvidas na atividade flagelar estão associadas com a membrana plasmática do flagelo (ÕURA; TOSHIMORI, 1990; EDDY; O'BRIEN, 1994).

A membrana plasmática tem permeabilidade seletiva e atua como uma barreira, mantendo, assim, diferenças de composição entre o interior e o exterior da célula (SQUIRES et al., 1999a). Danos nesta estrutura podem levar a perda da homeostase com posterior morte da célula (AMANN; PICKETT, 1987). Portanto, a integridade da membrana plasmática exerce papel fundamental para a sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS; GRAHAM, 1992).

2.1.2. Acrossomo

Exteriormente aos dois terços anteriores da cabeça, há um capuz espesso, chamado acrossomo, que é formado, sobretudo, a partir do aparelho de Golgi. Este contém uma quantidade de enzimas semelhantes às encontradas nos lisossomos da célula típica, inclusive hialuronidase, que podem digerir filamentos de proteoglicanos dos tecidos e enzimas proteolíticas. Estas enzimas desempenham papéis importantes para que ocorra a penetração do material genético masculino no oócito (GUYTON; HALL, 1997).

Desta forma, a reação acrossômica, caracterizada pela liberação das enzimas acrossomais, é um evento essencial para a penetração do espermatozóide na zona pelúcida e

fusão com a membrana plasmática do oócito (DIAZ-PERES et al., 1988). Portanto, a integridade do acrossomo, bem como a manutenção de suas enzimas são cruciais para que ocorra a fertilização (GADELLA, 2000).

2.1.3. Mitocôndria

A mitocôndria é uma organela presente em todos os tipos celulares e constitui um exemplo de interação morfo–funcional, pois fornece a fundação sobre a qual estão localizadas as moléculas que participam nas reações que transferem energia depositada nas fontes calóricas para a molécula de ATP (DE ROBERTIS; HIB, 2001).

Na maioria das células é uma organela de forma esférica (BEREITER-HAN, 1990), ainda que existam mudanças sutis de forma em virtude de sua atividade e está localizada nas regiões celulares onde a demanda energética é maior. Em alguns tipos celulares localizam-se em locais fixos, como no caso dos espermatozóides, em que estão presentes na porção da peça intermediária e apresentam-se na forma cilíndrica e alongada (ALBERTS et al.,1999)

Possui duas membranas, uma externa e outra interna, que estabelecem dois compartimentos: o espaço intermembranoso e a matriz mitocondrial. A membrana externa é permeável a todos os solutos do citosol, exceto macromoléculas, devido à presença na bicamada lipídica de proteínas transmembranosas chamadas porinas, que formam canais aquosos, por onde passam livremente íons e moléculas de até 5 kDa. A membrana interna apresenta invaginações na direção da matriz, formando as cristas mitocondriais para aumentar a superfície membranosa. Nela estão localizadas, entre outros, moléculas que compõem a cadeia transportadora de elétrons e cardiolipinas – um fosfolipídeo duplo que impede a

passagem de qualquer soluto através da bicamada lipídica, exceto O_2, CO_2, H_2O, NH_3 e ácidos graxos (DE ROBERTIS; HIB, 2001).

O espaço intermembranoso possui conteúdo de solutos semelhante ao citosol, ainda que tenha uma elevada concentração de H^+ (DE ROBERTIS; HIB, 2001).

A matriz mitocondrial contém várias cópias de um DNA circular e grânulos de Ca^{2+} e várias enzimas importantes na fosforilação oxidativa e no ciclo de Krebs (BEREITHER-HAHN, 1990).

A principal função da mitocôndria é a produção de ATP. Por meio da descarboxilação oxidativa, do ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa, esta organela transfere ao ADP (para formar ATP) a energia existente nas ligações químicas das moléculas energéticas do meio. A descarboxilação oxidativa ocorre na matriz mitocondrial e transforma uma molécula de piruvato em duas de acetila, gerando energia para formar um NADH. A molécula de acetila liga-se à enzima Co-A, formando acetil CoA, que dará início ao ciclo de Krebs, ainda na matriz mitocondrial; ao final de cada ciclo forma-se um ATP, três NADH e um $FADH_2$. As moléculas de CO_2 formadas durante a descarboxilação oxidativa e do ciclo de Krebs são transferidas para o espaço extracelular. Por fim, a fosforilação oxidativa ocorre na membrana interna da mitocôndria; os átomos de hidrogênio liberados dos NADH e dos $FADH_2$, em conseqüência de ambas oxidações, são dissociados em H^+ e e^-. Os e^- são transportados por enzimas presentes na membrana interna mitocondrial e em cada passagem é liberada energia, que é utilizada para transportar os H^+ da matriz mitocondrial para o espaço intermembranoso, pois este é um transporte ativo, já que os H^+ são transportados de um meio de menor concentração para um mais concentrado (HEUVEL; SMEITINK, 2001).

Este movimento de H^+ gera um gradiente de voltagem, ou potencial de membrana ($\Delta\psi m$), através da membrana mitocondrial interna, com o lado interno (matriz) negativo e o

lado externo (espaço intermembranoso) positivo (GRIFFITHS, 2000; FREY; MANNELA, 2000).

O gradiente de pH (ΔpH) dirige H^+ de volta à matriz e OH^- para fora da matriz, reforçando o efeito do Δψm, que atua atraindo qualquer íon positivo para dentro da matriz e força qualquer íon negativo para fora. Juntos, o ΔpH e o Δψm constituem o gradiente eletroquímico de prótons, que por sua vez, direciona H^+de volta à matriz através da ATP sintetase, um complexo protéico transmembrânico que utiliza a energia do fluxo de H^+ para sintetizar ATP a partir de ADP e Pi na matriz. A ATP sintetase é capaz de produzir mais de cem moléculas de ATP por segundo e três ou quatro prótons devem passar por ela para produzir cada molécula de ATP (ABBERTS et al., 2004). Portanto, em células fisiologicamente funcionais a manutenção do Δψm é essencial para a síntese de ATP (GRIFFITS, 2000).

2.2. Crioinjúrias espermáticas

O espermatozóide tem uma diversidade de atributos funcionais altamente diferenciados regionalmente, que devem ser mantidos até a fertilização. A criopreservação ideal deve, então, ter o compromisso de preservar o maior número de células possível e a integridade de diferentes estruturas espermáticas (WATSON, 1995).

No entanto, a exposição da célula a temperaturas abaixo da fisiológica, mesmo antes de ocorrer a congelação (no processo de estabilização da célula espermática), é responsável por mudanças na organização bi-dimensional dos lipídeos da membrana, diminuindo a longevidade dos espermatozóides pós-descongelação (HOLT, 2000).

A severidade dos efeitos da refrigeração na criopreservação depende da velocidade de resfriamento, dos intervalos de temperatura e do ponto de temperatura (WATSON, 1981)., sendo geralmente mais severos os efeitos entre 19 e 8°C (GRAHAM, 1996)

A explicação para tais efeitos deletérios à célula possivelmente está relacionada com a fase de transição dos lipídeos de membrana, resultando na separação de fase e perda da seletividade, característica das membranas biológicas de células vivas (WATSON; MORRIS,1987). A congelação convencional causa danos físico-químicos nesta estrutura, atribuídos a mudanças na fase lipídica e/ou aumento da peroxidação lipídica (ALVAREZ; STOREY, 1992).

As proteínas integrais da membrana são agrupadas na fase de separação lipídica, e isto pode culminar em alterações funcionais, como dos canais de íons (WATSON, 2000). A permeabilidade da membrana aumenta após resfriamento (ROBERTSON et al., 1988), podendo ser devido a mudanças nos canais protéicos específicos. A regulação do cálcio é claramente afetada pelo processo de resfriamento e isto tem conseqüências sérias em termos de função celular (BAILEY; BURH, 1994); em muitos casos, a mudança é incompatível com a viabilidade celular. A entrada do cálcio durante o resfriamento do espermatozóide contribui tanto para mudanças importantes na capacitação espermática, quanto para eventos de fusões de membranas plasmática e acrossomal (WATSON, 2000), ou seja, reação acrossomal.

Holt e North (1984) afirmaram ocorrer lesões irreversíveis na membrana plasmática espermática após congelação, indicativa de separação de fase, presumidamente induzida por transição na fase lipídica.

Dez anos após, Buhr et al. (1994) encontraram mudanças na fluidez da membrana plasmática de espermatozóides de cachaços durante resfriamento, congelação e descongelação, sendo algumas irreversíveis.

Quanto a lesões estruturais de acrossomo, Alvarenga et al. (1998), avaliando os efeitos da criopreservação no espermatozóide equino, documentaram um discreto espessamento do segmento apical, com frequente ondulação, além de casos de ruptura da membrana acrossomal externa e conteúdo acrossomal menos denso e homogêneo, ou mesmo a completa ausência do acrossomo em amostras descongeladas.

Os principais fatores que afetam a fluidez característica da membrana plasmática são sua composição relativa entre fosfolipídeos e colesterol e a temperatura na qual a membrana é exposta. Com a queda da temperatura, os lipídeos passam pela transição de estado fluído para gelatinoso, no qual as cadeias de ácidos graxos organizam-se em um modelo paralelo (HAMMERSTEDT et al., 1990), ficando, assim, impossibilitados de se moverem aleatoriamente, resultando na formação de domínios cristalinos, com apenas pequenas regiões de lipídeos no estado líquido, onde ficam aderidas as proteínas (COTTORELLO; HENRY, 2002), produzindo uma estrutura rígida. Deste modo, áreas da membrana plasmática tornam-se fracas, sujeitas a rupturas, fusões e permeáveis a íons, como o cálcio. Estes íons contribuem para mudanças no estado de capacitação e nos eventos fusionais entre a membrana plasmática e a membrana acrossomal externa, característicos da reação acrossomal (HAMMERSTEDT et al., 1991; WATSON, 2000).

Em adição, elementos do citoesqueleto são temperatura-sensitivos. Hall et al. (1993) encontraram que o resfriamento de células provocou a despolimerização de filamentos de actina F. Spungin et al. (1995) concluíram que a despolimerização da actina F do citoesqueleto é um passo necessário para a aproximação das membranas plasmática e acrossomal externa, promovendo a exostose acrossomal (reação acrossomal). É possível que este fato possa contribuir para a fusão desorganizada e precoce dessas membranas após resfriamento e congelação (WATSON, 2000).

Ainda, durante o processo de criopreservação, há formação de cristais de gelo no interior celular. Quando uma solução contendo concentrações salinas fisiológicas é resfriada abaixo do seu ponto de congelação, existe a formação de gelo neste meio. Os cristais que se formam são compostos exclusivamente de moléculas de água e os sais dissolvidos permanecem na porção não congelada da amostra (PEGG; DIAPER, 1989). Com a contínua queda de temperatura, adicional cristalização da água ocorre, levando ao aumento da concentração de sais na fração não congelada (AMANN; PICKETT, 1987). Altas concentrações de sais podem desidratar a célula espermática, levando à deformação celular (HAMMERESTED, 1990). Como conseqüência, o espermatozóide sofre danos irreversíveis, caracterizados por movimentos anormais (circular ou retrógrado), rápida perda da motilidade, danos ao acrossoma e membrana plasmática, redução do metabolismo e perda de componentes intracelulares (GRAHAM, 1996).

Assim, num estudo mais minucioso, Barthelemy et al. (1990), utilizando microscopia eletrônica em espermatozóide humano, observaram aumentos de 19 para 62% de danos em membrana plasmática e de 30 para 80% de danos acrossomais em amostras a fresco e congelada, respectivamente.

Oehinger et al. (2000) relataram os efeitos da criopreservação sobre os espermatozóides humanos, como a perda da estabilidade da bicamada de lipídios causada pela desidratação celular, alterações dos componentes da membrana celular, desnaturação de proteínas da membrana, alterações do metabolismo energético celular, lesões na membrana acrossomal, injúrias do DNA e cristalização eutética dos solutos intracelulares, levando à morte celular.

Souza (2001) avaliou sêmen pós-descongelação de garanhões com auxílio da microscopia óptica e de epifluorescência (H258/PSA) e encontrou, aproximadamente, 41% de motilidade progressiva e 58% de células com membranas plasmática e acrossomal lesadas.

O`Connell et al. (2002) encontraram diminuição na motilidade progressiva (CASA) de 22,9 para 13,6%, na viabilidade espermática (eosina Y) de 81,2 para 55,8% e na atividade mitocondrial (Rodamina123 - R123) de 25,3 para 13,2% examinando sêmen humano à fresco e congelado, respectivamente, e aumento na percentagem de células com anormalidades morfológicas de cabeça, peça intermediária e cauda.

Donnelly et al. (2001) encontraram que a criopreservação provocou diminuição de 50% da motilidade progressiva (CASA) do sêmen humano, além da diminuição em 20% da integridade do DNA (*Comet Assay*).

Somando-se ainda aos já citados danos da criopreservação ao espermatozóide, Arruda et al. (2002) encontraram que as dimensões morfométricas (ASMA) da cabeça de espermatozóides eqüinos criopreservados em diferentes extensores e crioprotetores, foram estatisticamente menor do que as dimensões dos espermatozóides à fresco diluídos. Os autores ainda hipotetizaram que esta diferença dimensional pode ser devido a danos acrossomais ou devido a hipercondensação do material genético, provocados pela criopreservação.

2.3. Concentração e volume de armazenamento do sêmen criopreservado

Inicialmente o sêmen congelado eqüino foi armazenado em *pellets* (MERKT et al., 1975). Posteriormente, foram armazenados em tubos de alumínio (TISCHNER, 1979; LOVE et al., 1989) e macrotubos de 1,0, 2,5, 4,0 e 5,0 mL (ARRUDA et al., 1994; LOOMIS et al.1983; MARTIN et al.,1979; PAPA et al., 1989; VIEIRA, 1993).

Vierth, em 1979, comparando o armazenamento do sêmen equino congelado em *pellets* (0,2 mL) e em macrotubo de 5mL, encontrou motilidades total média e percentagem de acrossomos normais semelhantes entre as duas formas de armazenamento. Mas o próprio autor destacou os inconvenientes da conservação seminal em *pellets* o contato direto da célula espermática com o nitrogênio líquido e a não identificação discriminada de cada *pellet*, além da maior facilidade de manejo da dose inseminante do sêmen armazenado em macrotubo.

Desta forma, então, a congelação seminal em macrotubos passou a proporcionar uma maior facilidade no manuseio da dose inseminante no momento da descongelação, quando da utilização da inseminação artificial no corpo uterino, com 500 x 10^6 de espermatozóides móveis pós-descongelação.

Posteriormente, Alvarenga et al. (1998) e Loomis e Clark (1998) afirmaram que a congelação do sêmen eqüino em palhetas de menor volume oferece melhor qualidade seminal pós-descongelação. Então, as palhetas de 0,50 e 0,25 mL passaram a ser utilizadas em eqüinos (VISELINOVIC et al, 1980; ARRUDA et al, 1986; VOLKMAN, 1987; ARRUDA et al, 1993a; ARRUDA et al., 1993b; PAPA et al., 1993; VIEIRA e DUARTE, 1993, HEITLAND et al., 1996; BLANES et al., 2005; DORES et al., 2005). Isto porque a taxa de resfriamento é mais uniforme nestas palhetas do que para outros sistemas, pois estas possuem uma maior área de superfície em relação ao volume, que permite taxas de resfriamento, congelação, descongelação e aquecimento mais uniformes e adequadas (AMANN; PICKETT, 1987; HAMMERSTEDT et al.,1991; GRAHAM, 1996; LOOMIS; CLARK, 1998), além destas poderem ser armazenadas mais eficientemente.

Tal afirmação foi reiterada por Heitland et al. (1996), que encontraram maiores valores de motilidade progressiva (%) e velocidade curvilinear (µm/s), avaliadas por sistema computadorizado, em amostras de sêmen congeladas com glicerol 4 % em palhetas de 0,50

mL (38 % e 109 µm/s, respectivamente), do que as congeladas em macrotubos de 2,5 mL (31 % e 99 µm/s, respectivamente).

Para a continuidade dos trabalhos de melhora das características seminais pós-descongelação do sêmen eqüino, resta saber, dentre os dois menores volumes utilizados de 0,50 e 0,25 mL, se há alteração na qualidade seminal.

Com esta preocupação, Papa e Dell'Aqua (2001) compararam resultados laboratoriais de sêmen eqüino criopreservado, armazenado em palhetas de 0,50 e 0,25 mL e descongelado a 38°C/40s e 38°C/30s, respectivamente, e encontraram melhores resultados quando utilizaram palhetas de 0,25 mL. No entanto, quanto aos resultados de fertilidade, encontrados pelos mesmos, a maior taxa de prenhez foi observada no grupo de éguas inseminadas pré e pós-ovulação com sêmen envasado em palhetas de 0,50mL (50%), em comparação a taxa de 20% resultante das inseminações com o sêmen armazenado em palhetas de 0,25mL.

Quanto à concentração espermática da palheta, Angola et al. (1992) sugeriram ser provável que a qualidade seminal pós-descongelação esteja diretamente relacionada com a quantidade de agentes crioprotetores por unidade de volume. Entretanto, Papa et al. (1989) encontraram índices de fertilidade semelhantes em éguas inseminadas com sêmen congelado armazenado em macrotubos alemães de 4 mL, na concentração espermática de 100 x 10^6 espermatozóides /mL e em palhetas de 2 mL, contendo 200 x 10^6 de espermatozóides/mL.

Já Heitland et al. (1996) comprovaram a teoria de Angola et al. (1992), testando a característica de movimento do sêmen eqüino descongelado com 4 % de glicerol em 5 diferentes concentrações espermáticas em palhetas de 0,50 mL (20, 200, 400, 800 e 1.600 x 10^6 sptz/mL) e encontraram melhores resultados de motilidade total e progressiva nas amostras de concentrações 20, 200 e 400 x 10^6sptzs/mL do que nas de 800 e 1.600 x 10^6sptz/mL.

No entanto, Leipold et al. (1998) realizaram teste de fertilidade nas concentrações espermáticas 1.600 x 10^6sptz/mL e 400 x 10^6sptz/mL do sêmen congelado eqüino em palhetas de 0,50 mL e encontraram os melhores resultados de prenhez quando utilizaram o primeiro tratamento, independentemente da dose inseminante utilizada (320 x 10^6sptz móveis ou 800 x 10^6sptz móveis).

2.4. Associação de sondas fluorescentes para avaliação da integridade das membranas acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial

Todos os testes laboratoriais de análise de sêmen buscam a predição da capacidade fertilizante do sêmen. Dentre esses exames, a técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara (CELEGHINI, 2005).

Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática espermática, como o brometo de etídio (BILGILI; RENDEN, 1984; HALANGK et al., 1984; PETERSON et al., 1974), corantes supravitais Hoechst 33258 (H258), 33342 (H342) (CASEY et al., 1993; DE LEEUW et al., 1991; MAXWELL et al., 1997), SYBR-14 (GARNER et al., 1999; THOMAS et al., 1998) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (HARRISON; VICKERS, 1990; PEÑA et al., 1998; SOUZA, 2001; VALCÁRCEL et al., 1994); todavia, o iodeto de propídio (PI) vem se destacando em pesquisas pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica, estabilidade e eficiência na avaliação da integridade da membrana (GRAHAM et al., 1990), seja isoladamente ou associada a outro corante fluorescente para avaliar membrana plasmática. Esta sonda possui

afinidade ao DNA e cora em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesada (ARRUDA, 2000, ARRUDA et al., 2003a, BAYARI et al., 1990; GARNER et al., 1986, 1988; GRAHAM et al., 1990; MAXWELL et al., 1997).

Já a aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), quando conjugada a isotiocionato de fluoresceína (FITC), marca com sucesso o acrossomo espermático na cor verde amarelado, o que facilita a visualização e a identificação dos acrossomos lesados, sendo utilizado em espermatozóides humanos (CROSS et al., 1986; MENDOZA et al., 1992; TESARIK et al., 1993), bovinos (GRAHAM et al., 1990), eqüinos (ARRUDA, 2000, 2003a; CASEY et al., 1993; FARLIN et al., 1992) e suínos (MATTIOLI et al., 1996).

O uso da FITC-PSA para avaliar a integridade do acrossomo de células espermáticas eqüinas *in natura* ou submetidas à crioinjúria foi investigado (FARLIN et al., 1992; ARRUDA et al., 2003b). Para tanto, misturas de diferentes proporções de espermatozóides com acrossomo intacto (sêmen fresco) e espermatozóides com acrossomo danificado (sêmen criopreservado) foram avaliadas. Houve correlação positiva entre a porcentagem de espermatozóides ligados ao FITC-PSA e a proporção de espermatozóides com acrossomo danificado nas amostras ($r = 0,98$; $P < 0,05$), comprovando a eficiência de seu uso na determinação da integridade do acrossomo de espermatozóides (FARLIN et al., 1992).

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

Quanto à peça intermediária do espermatozóide, existem sondas fluorescentes próprias para avaliação da funcionalidade mitocondrial, dentre os quais destaca–se o carbocianina catiônica lipofílico JC-1 (iodeto de 5,5`,6,6`-tetracloro1,1`,3,3`-tetraetilbenzimidazolocarbocianina) (SMILEY et al., 1991). Esta sonda possui baixa toxicidade, boa solubilidade e características fluorescentes apropriadas para detecção por sistema de filtros, comumente usada em microscopia de epifluorescência (SMILEY et al., 1991).

Este corante necessita de $\Delta\psi m$ altamente negativo para penetrar na organela e emitir fluorescência nos comprimentos de onda de luz vermelha ou verde, de acordo com sua concentração interna final. Em altas concentrações, o corante apresenta–se na forma de j-agregado e emite coloração vermelha, enquanto que em baixas concentrações encontra-se na forma de monômero e emite coloração verde. Então, em mitocôndrias funcionais, que apresentam $\Delta\psi m$ altamente negativo (-180 mV), o JC-1 penetra e acumula-se no interior desta organela e emite coloração vermelha (REERS, 1991). Assim, a formação e manutenção de j-agregado no interior da mitocôndria é dependente do gradiente eletroquímico (SMILEY, 1991).

O JC-1 possui uma absorbância máxima de 510 e 585 nm e uma fluorescência máxima de 520 e 585 nm para monômeros e j-agregados, respectivamente.

Para avaliar a eficiência do JC-1 em predizer a funcionalidade da mitocôndria, ou seja, a capacidade desta organela em produzir ATP, Bradbury et al. (2000) coraram células leucêmicas humanas com este fluocromo e encontraram alta correlação positiva ($r = 0,872$; $P<0,01$) entre a quantidade de ATP intracelular e a percentagem de células com alto $\Delta\psi m$ e alta correlação negativa ($r = -0,889$; $P<0,01$) entre ATP e células com baixo $\Delta\psi m$.

Quanto ao estudo da célula espermática, este corante fluorescente também vem sendo utilizado com sucesso para estimar o potencial de membrana mitocondrial, em diferentes

espécies, como a bovina (GARNER et al., 1997; THOMAS et al., 1998), eqüina (GRAVANCE et al., 2000, 2001), ovina (MARTINEZ-PASTOR et al., 2004) e humana (TROIANO et al., 1998).

Utilizando JC-1, Troiano et al. (1998) encontraram que a quantidade de espermatozóides humano com mitocôndria despolarizada correlaciona positivamente com a percentagem de células imóveis ($r = 0,52$; $p = 0,004$) e negativamente com a motilidade progressiva rápida ($r = -0,55$; $p = 0,002$).

Martinez-Pastor et al. (2004), trabalhando com espermatozóides descongelados de carneiro, encontraram correlações médias significativas entre a percentagem de células com alto $\Delta\psi m$ e motilidade total ($r = 0,33$; $P<0.05$) e com motilidade progressiva ($r = 0,40$; $P<0.01$); no entanto, as correlações de alto $\Delta\psi m$ e VSL (velocidade progressiva), VCL (velocidade curvilinear), VAP (velocidade do trajeto) e ALH (deslocamento lateral de cabeça) foram baixas.

Assim, as associações de sondas fluorescentes permitem avaliar concomitantemente mais do que um compartimento da célula espermática. Celeghini (2005), preconizando a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial da membrana mitocondrial de uma mesma célula espermática, de forma clara e fácil, testou e validou quatro técnicas de associação de sondas para bovinos. Dentre as técnicas validadas (PI, FITC-PSA e MITOTRACKER GREEN FM; PI, FITC-PSA e CMXRos ou PI, FITC-PSA e JC-1), a autora concluiu ser a associação das sondas PI, FITC-PSA e JC-1 a melhor para ser utilizada, já que esta permite separar duas populações de células com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial de maneira mais clara.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local e Período

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus Administrativo de Pirassununga. O período experimental estendeu-se de Janeiro a Abril de 2005.

3.2. Animais

Foram utilizados quatro garanhões de sela, com idades entre 7 e 17 anos, conhecidamente férteis, pertencentes ao Setor de Eqüideocultura da Prefeitura do Campus Administrativo da Universidade de São Paulo – Pirassununga, SP. Todos foram mantidos sob as mesmas condições de manejo, sendo alojados em baias e soltos individualmente em piquetes apropriados três vezes por semana e alimentados com feno, capim, concentrado e sal mineral de acordo com as indicações do NRC.

3.3. Colheita do sêmen

Antes da realização deste experimento foi realizado o nivelamento biológico de cada animal, com quatro colheitas de sêmen, intercaladas por três dias, sendo que a última colheita foi realizada uma semana antes do início do experimento propriamente dito.

Previamente às colheitas, foram realizadas higienizações do pênis dos garanhões com algodão umedecido em água a 33 °C.

Oito ejaculados de cada garanhão foram colhidos utilizando vagina artificial modelo Missouri, apresentando temperatura interna em torno de 42 °C.

O sêmen foi filtrado imediatamente após a colheita, para a separação da fração rica em espermatozóides da fração gelatinosa.

3.4. Avaliações do sêmen pré-congelação

3.4.1. Volume

O volume foi determinado pela leitura direta em proveta de 150 mL, pré – aquecida a 37°C.

3.4.2. Motilidade Total Subjetiva e Vigor

A motilidade total e o vigor foram avaliados em uma gota de sêmen *in natura* entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37 ^{o}C) sob microscopia óptica (ZEISS®, mod. ICS-standard 25) em aumento de 100x. A motilidade foi dada pela estimativa visual da porcentagem de células em movimento, enquanto que o vigor foi referente à velocidade progressiva uniforme das células em movimento, classificado em escores de 1 a 5, sendo o escore 1 o mais lento e aumentando gradativamente até o escore 5, correspondendo ao mais rápido movimento progressivo uniforme.

3.4.3. Concentração Espermática

A concentração espermática foi determinada, em milhões de espermatozóides por mililitro, com auxílio de Câmara de Neubauer, sob microscopia óptica comum (NIKON®, mod. YS-2), em aumento de 400x. Para a leitura, o sêmen foi diluído na proporção de 1:100, ou seja, 10 µL de sêmen: 990 µL de formol salino tamponado.

3.4.4. Avaliação Computadorizada das Características do Movimento Espermático (*Computer Assisted Semen Analysis* - CASA)

Para a avaliação da motilidade espermática pelo sistema computadorizado (CASA), uma amostra do sêmen foi diluída em meio TALP *sperm* (BAVISTER *et al.*, 1983) (Anexo 1), na concentração de 25×10^{6} espermatozóides/mL. Dois microlitros desta solução foram

colocados na câmara de leitura (Leja® standard count, SC20.01.FA, 20 micron), a qual foi inserida no aparelho modelo Ivos-Ultimate da Hamilton Thorne Biosciences, que captura a imagem da amostra por um microscópio acoplado a um computador e digitaliza esta imagem a fim de ser analisada pelo *software.* Para isto, cada célula espermática é identificada e sua trajetória reconstruída (VERSTEGEN et al., 1992), sendo previamente ajustado (*setup*) para a análise de sêmen eqüino, conforme Anexo 3. O mínimo de 12 campos foi selecionado para a leitura e análise, buscando sempre os melhores.

As características analisadas foram: motilidade total (MTCA, %), motilidade progressiva (MPRO, %), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilinear (VCL, µm/s), deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm), freqüência de batimento flagelar (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %), cujas definições foram descritas por Arruda (2000).

3.4.5. Avaliação das Membranas Plasmática, Acrossomal e Mitocondrial

Para esta análise, 150 µL de uma amostra do sêmen diluído em meio TALP *sperm* (Anexo 1), na concentração de 25×10^6 espermatozóides/mL, foi colocada em um microtubo, adicionados 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS – Anexo 2), 3 µL de JC-1 (153 µM em DMSO – Anexo 2) e 80 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS – Anexo 2). Em seguida, a amostra foi incubada por 8 minutos a 37°C, protegida da luz. Após a incubação, uma gota (6 µL) desta solução foi utilizada para o preparo da câmara úmida, entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37°C) e a leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência - Nikon®, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420)

apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485), B-2E/C (excitação 465-495 e emissão 515-555) e G-2E/C (excitação 540-525 e emissão 605-655), com aumento de 1.000 x.

As células foram classificadas em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, conforme quadro 1. Na figura 1 estão ilustradas seis dessas células.

CATEGORIAS	SIGLAS
Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Intacto e Alto Potencial de Membrana Mitocondrial	PIAIA
Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Intacto e Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial	PIAIB
Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Alto Potencial de Membrana Mitocondrial	PIALA
Membrana Plasmática Intacta, Acrossomo Lesado e Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial	PIALB
Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Alto Potencial de Membrana Mitocondrial	PLAIA
Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Alto Potencial de Membrana Mitocondrial	PLALA
Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Intacto e Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial	PLAIB
Membrana Plasmática Lesada, Acrossomo Lesado e Baixo Potencial de Membrana Mitocondrial	PLALB

Quadro 1. Classificação das células de acordo com a integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, detectadas pelas sondas PI, FITC-PSA e JC-1, respectivamente, Pirassununga - 2006

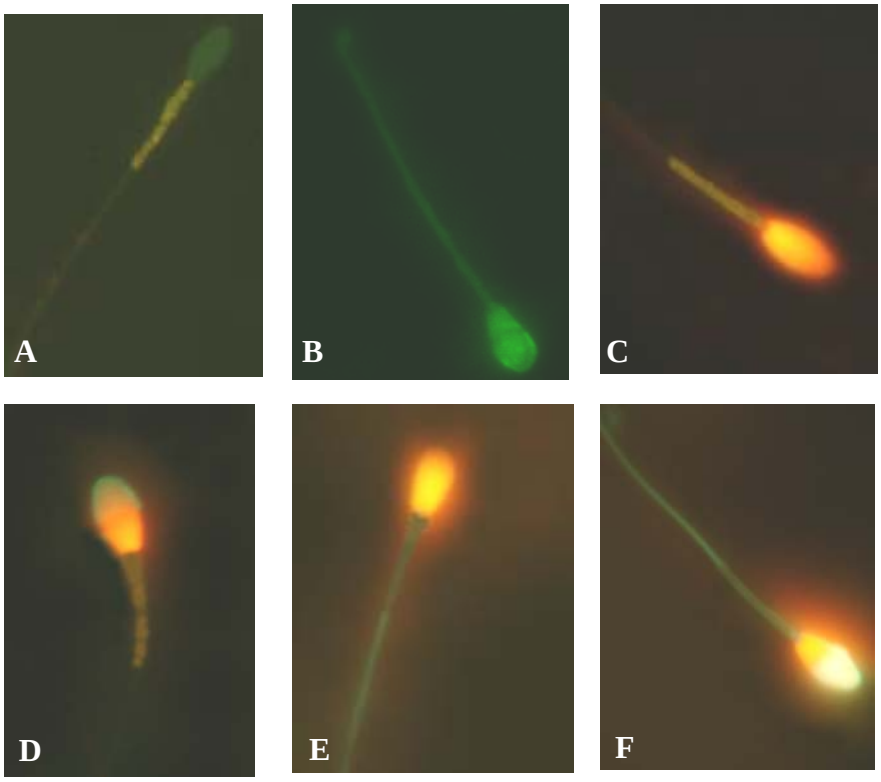

Figura 1. Fotomicrografia de epifluorescência das células espermáticas coradas com a associação das sondas fluorescentes PI, FITC-PSA e JC-1 (aumento 1.000 x). **A**. Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA). **B**. Célula com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com baixo potencial de membrana mitocondrial (PIAIB). **C**. Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial (PLAIA). **D**. Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com alto potencial de membrana mitocondrial (PLALA). **E**. Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e com baixo potencial de membrana mitocondrial(PLAIB). **F**. Célula com membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e com baixo potencial de membrana mitocondrial (PLALB) - Pirassununga -2006

Após a distinção das oito categorias celulares, foram selecionadas as percentagens das células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA) as percentagens das membranas plasmáticas intactas (MPI), das membranas acrossomais intactas (MAI) e das peças intermediárias com alto potencial de membrana mitocondrial (APM), individualmente.

3.4.6. Avaliação das Características Morfológicas

As avaliações das características morfológicas dos espermatozóides foram realizadas pela técnica da câmara úmida. Para isso, o sêmen foi diluído e fixado em formol salino tamponado, previamente aquecido (37° C). Uma gota do sêmen diluído entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37° C, foi preparada e a avaliação foi realizada pela contagem de 200 células em aumento de 1.000 x sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (Nikon®, modelo 80i).

3.5. Preparação e Criopreservação do Sêmen

3.5.1. Centrifugação

Após a retirada de amostra para avaliações pré-congelação, descritas acima, o sêmen foi diluído em extensor a base de leite desnatado (KENNEY, 1975), aquecido a 37 °C sem adição de antibiótico, na proporção 1:1. Este foi distribuído em tubos graduados para centrífuga de 15 mL (37 °C) e centrifugado a 500 x g durante 10 minutos, para a sedimentação celular. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e ao sedimento resultante foi adicionado 200 µL do diluidor Botu-Crio® (Biotech Ltda/ME, Botucatu, SP, Brasil) para manutenção das células durante a reavaliação da concentração espermática.

3.5.2. Avaliação da concentração espermática do sedimento celular

A avaliação da concentração espermática do sedimento foi realizada segundo descrito no item 3.4.3., sendo a amostra retirada do sedimento resultante da centrifugação, adicionado dos 200 µL do diluidor.

3.5.3. Ressuspensão do sedimento espermático

Após avaliação da concentração espermática do sedimento, e de acordo com os resultados obtidos, foi realizada a ressuspensão do sedimento em diluidor Botu-Crio® (Biotech Ltda/ME, Botucatu, SP, Brasil) em três diferentes diluições, resultando em três grupos de concentrações finais:

- C100 - 100 x 10^6 espermatozóides /mL;
- C200 - 200 x 10^6 espermatozóides /mL;
- C400 - 400 x 10^6 espermatozóides /mL.

3.5.4. Envase do sêmen

Após homogeinezação, cada amostra das três concentrações finais foi envasada em palhetas francesas de 0,50 e 0,25mL, as quais foram cuidadosamente lacradas com álcool polivinílico em pó, identificadas com o nome do garanhão, a partida do ejaculado e a concentração espermática final. Para facilitar a identificação e a avaliação de cada tratamento, foi padronizado álcool polivinílico e caneta marcadora da cor vermelha para o grupo C100, verde para C200 e laranja para C400.

Na figura 2 tem-se o esquema simplificado do processamento e da criopreservação do sêmen deste experimento.

3.5.5. Criopreservação do sêmen

A criopreservação do sêmen foi realizada utilizando um sistema de criopreservação portátil (TK 3000®, TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, MG, Brasil), composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas, um tubo de resfriamento e uma caixa térmica para nitrogênio líquido.

Para o resfriamento, as palhetas foram colocadas no porta-palhetas, o qual foi acondicionado ao tubo de resfriamento, permanecendo neste até alcançar 5°C, obecendo a uma curva de resfriamento de -0,25^{o}C/minuto, com duração aproximada de 1 hora e 15 minutos. Ao atingir 5°C, o porta-palhetas foi removido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido, na qual a curva de congelação foi procedida com uma taxa de -15°C/minuto de 5°C até -80°C, após alcançar essa temperatura, a taxa passou a ser de -10°C/minuto até -120°C. A curva de congelação durou, em média, 12 minutos, quando as palhetas foram removidas do porta-palhetas e imersas em nitrogênio líquido (-196°C). As palhetas foram colocadas cuidadosamente em *racks* identificadas com nome do garanhão e concentração espermática final, utilizando canetas de cores distintas para esta identificação, segundo já descrito no item 3.5.4, sendo padronizada a localização das palhetas de 0,50 mL nos *gobellets* superiores e as palhetas de 0,25 mL nos *gobellets* inferiores. Por fim, as *racks* foram armazenadas em botijões criogênicos.

3.6. Descongelação do sêmen

Duas palhetas de sêmen de cada tratamento e garanhão, de uma mesma partida, foram descongeladas a 37°C por 30 segundos (AMANN; PICKETT, 1987) e o sêmen colocado em um tubo para microcentrífuga de 1,5 mL, pré - aquecido a 37°C.

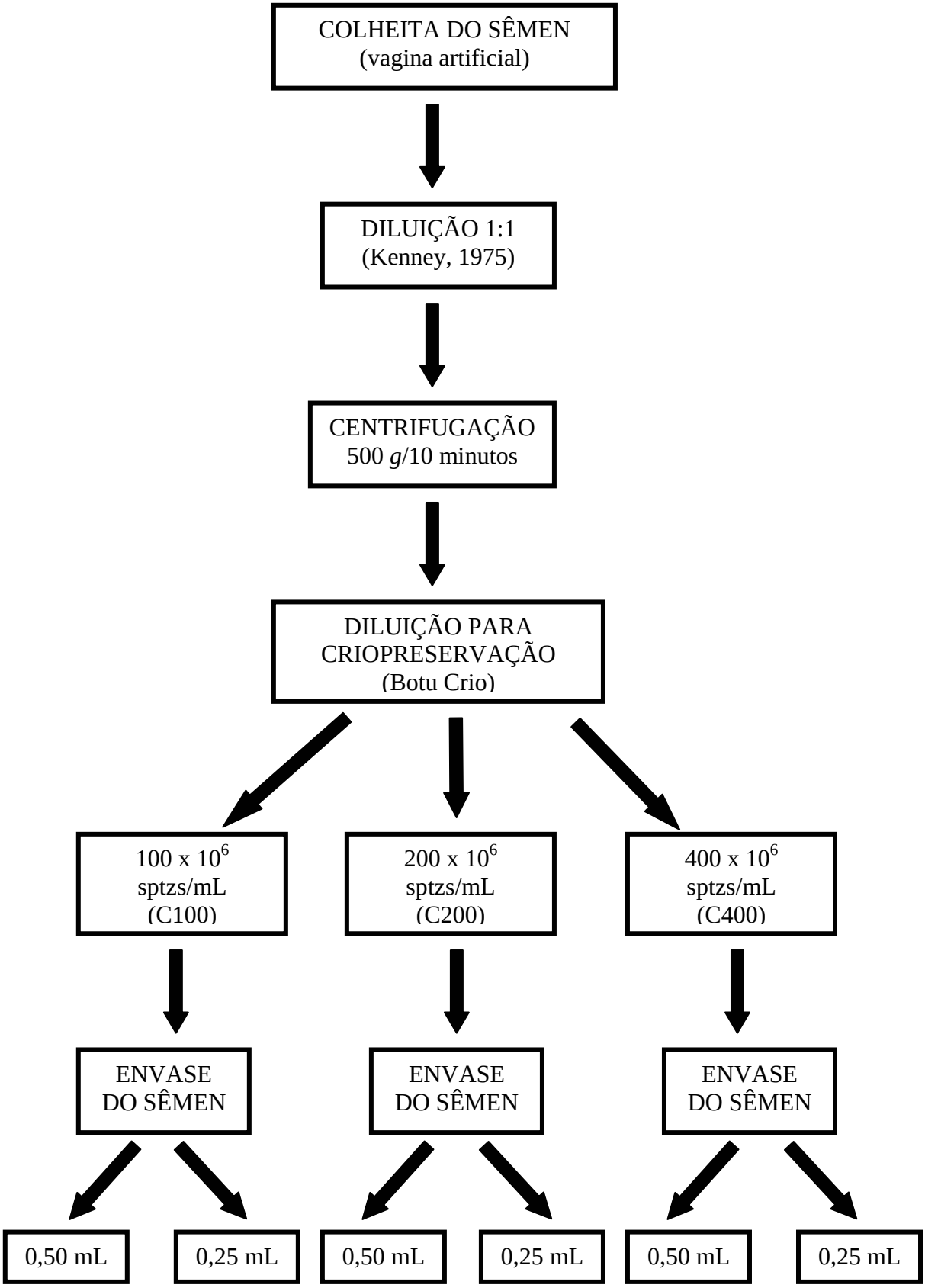

Figura 2. Esquema simplificado do processamento do sêmen para criopreservação.

3.7. Avaliações do sêmen pós-descongelação

3.7.1. Avaliação computadorizada de características do movimento espermático (CASA)

A avaliação da motilidade espermática pelo sistema computadorizado (CASA) do sêmen pós-descongelado foi realizada com uma gota de sêmen diluído em TALP *sperm*, de maneira a resultar numa solução de 25 x 10^6 sptz/mL. Para tanto, foram realizadas três diluições diferentes, de acordo com as concentrações estudadas neste experimento (100, 200, e 400, x 10^6 sptz/mL): 250 µL das amostras C100 foram diluídas em 750 µL de TALP *sperm*; 130 µL das amostras C200 diluídas em 870 µL de TALP *sperm* e 60 µL das amostras C400 em 940 µL de TALP *sperm*. Após, 4 µL destas soluções foram acondicionadas entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37 °C e submetidas ao aparelho modelo Ivos-Ultimate® da Hamilton Thorne Biosciences, com os mesmos ajustes de *setup* realizado para o sêmen fresco (Anexo 4), as mesmas características analisadas para o sêmen *in natura* (MTCA, MPRO, VSL, VCL, ALH, BCF, STR e LIN), descritas no item 3.4.4, foram analisadas no sêmen pós-descongelação.

3.7.2. Avaliação da integidade das membranas plasmática acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

A avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, foi realizada pela associação das sondas PI, FITC-PSA e JC-1, como mencionados no item 3.4.5, com algumas alterações no protocolo de coloração do sêmen *in natura*, devido a presença do diluidor, como descrito a seguir.

Em C100, uma amostra de 250 µL de sêmen pós-descongelado foi adicionada em 750 µL de meio TALP *sperm*.; em C200, 130 µL de amostra descongelada foi diluída em 870 µL de TALP *sperm* e no C400, 60 µL de sêmen descongelado foi acrescentado em 940 µL de TALP *sperm*. Uma amostra de 150 µL de cada solução foi colocada em um tubo de microcentrífuga de 500 µL (aquecido a 37° C) onde foram adicionados 3 µL de PI (0,5 mg/mL em DPBS), 6 µL de JC-1 (153 µM em DMSO) e 80 µL de FITC-PSA (100 µg/mL em DPBS), também pré-aquecidos a 37° C. A amostra foi incubada por 8 minutos a 37° C. Após a incubação, uma gota (7 µL) foi utilizada para o preparo da câmara úmida, entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37° C) e a leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência, igualmente ao descrito no item 3.4.5. Como realizado no sêmen *in natura*, as células foram classificadas em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida e selecionadas as percentagens de células PIAIA, MPI, MAI e APM.

3.7.3. Avaliação das Características Morfológicas

A avaliação das características morfológicas dos espermatozóides foram realizadas da mesma forma descrita para o sêmen *in natura*, no item 3.4.6.

3.7.4. Análise Estatística

Este experimento foi delineado em blocos generalizados, sendo cada garanhão considerado um bloco, para eliminar qualquer efeito do animal nas respostas aqui estudadas. A unidade experimental foi considerada 1/6 do ejaculado.

Os dados das avaliações pré-congelação foram analisados quanto à medida de tendência central – média – e à medida de dispersão – desvio padrão.

Já os resultados obtidos das avaliações pós-descongelação foram analisados utilizando o programa *Statistical Analysis System* (SAS® Institute Inc., 1994), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE) e homogeneidade das variâncias (PROC MEANS); quando identificado *outliers*, estes foram removidos. Após a verificação das premissas da estatística, foi realizada análise de variância (PROC GLM), para observação dos efeitos dos tratamentos e interações destes e Teste SNK (teste de médias – PROC ANOVA) para as variáveis que demonstraram efeito dos tratamentos. A hipótese testada foi considerada significativa quando $P<0,05$.

O quadro de análise de variância está representado a seguir (Quadro 2).

Causa de Variação	Grau de liberdade
Tratamento	5
[Concentração]	[2]
[Volume]	[1]
[Concentração x Volume]	[2]
Bloco	3
Resíduo	183
Total	191

Quadro 2. Quadro de análise de variância para delineamento em blocos, estruturado em fatorial 2X3 – Pirassununga, 2006.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliações pré-congelação

As informações sobre a qualidade seminal pré-congelação serviram somente como um indicador da qualidade seminal dos garanhões a cada colheita, não objetivando a comparação entre animais.

Os valores médios e desvios padrão do volume, concentração, motilidade visual e vigor espermáticos do sêmen *in natura* nos diferentes garanhões estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Médias ± desvios padrão do volume (livre de gel), concentração, motilidade visual (MTV) e vigor espermáticos do sêmen *in natura* de cada garanhão - Pirassununga –2006.

Garanhão	Volume (mL)	Concentração ($x10^6$sptz./mL)	MTV (%)	Vigor
1 (n=8)	106,3 ±26,7	104,7 ±46,5	71,9 ±5,3	2,6 ±0,2
2 (n=8)	70,0 ±22,2	186,1 ±81,8	74,4 ±9,0	2,6 ±0,4
3 (n=8)	90,6 ±30,3	173,8 ±82,9	80,0 ±5,3	2,6 ±0,2
4 (n=8)	41,9 ±13,6	109,3 ±34,4	78,1 ±5,9	2,6 ±0,3
Média Total	**77,2 ±23,2**	**143,5 ±31,3**	**76,1 ±6,4**	**2,6 ±0,3**

Na tabela 2 têm-se as médias e seus respectivos desvios padrão das características de movimento espermático (avaliadas pelo sistema CASA) e na tabela 3, as percentagens médias de membrana plasmática intacta (MPI), membrana acrossomal intacta (MAI), alto potencial de membrana mitocondrial (APM) e células PIAIA, do sêmen *in natura* dos quatro garanhões utilizados no experimento.

Já as percentagens médias (± desvio padrão) das alterações morfológicas do sêmen *in natura* de cada garanhão estão demonstras na tabela 4.

Tabela 2 - Médias ± desvios padrão das características do movimento espermático do sêmen eqüino (in natura), avaliados pelo sistema CASA - Pirassununga –2006.

Garanhão	Características do movimento espermático							
	MTCA[1] (%)	**MTPRO[2] (%)**	**VSL[4](µm/s)**	**VCL[5](µm/s)**	**ALH[6](µm)**	**BCF[7] (Hz)**	**STR[8] (%)**	**LIN[9] (%)**
1 (n=8)	75,8 ±4,2	32,3 ±4,4	52,5 ±3,4	116,7 ±13,8	3,5 ±0,7	20,0 ±1,5	40,7 ±1,2	27,1 ±2,3
2 (n=8)	82,1 ±4,6	26,3 ±6,1	31,0 ±4,5	66,9 ±15,3	2,0 ±0,8	10,9 ±1,7	23,8 ±3,3	17,0 ±2,8
3 (n=8)	83,1 ±5,3	32,3 ±9,3	41,7 ±7,7	91,8 ±22,0	2,8 ±0,7	15,4 ±2,3	32,2 ±7,,3	22,0 ±5,5
4 (n=8)	84,6 ±4,8	34,4 ±7,7	41,7 ±6,5	91,8 ±17,2	2,8 ±0,6	15,4 ±1,8	32,2 ±6,,8	22,0 ±6,9
Média Total	**81,4 ±4,7**	**31,3 ±6,8**	**41,7 ±5,5**	**91,8 ±17,0**	**2,8 ±0,7**	**15,4 ±1,5**	**32,2 ±4,6**	**22,0 ±4,4**

MTCA[1]: motilidade total; MPRO[2]: motilidade progressiva; VSL[4]: velocidade progressiva; VCL[5]: velocidade curvilinear; ALH[6]: deslocamento lateral da cabeça ; BCF[7]: freqüência de batimento flagelar; STR[8]: retilinearidade e LIN[9]: linearidade.

Tabela 3 - Médias ± desvios padrão das percentagens de células espermáticas, classificadas de acordo com os resultados da microscopia de epifluorescência, do sêmen (in natura) dos garanhões em oito colheitas de sêmen - Pirassununga –2006.

Garanhão	**Classes de células**			
	MPI[1] (%)	**MAI[2] (%)**	**APM[3] (%)**	**PIAIA[4] (%)**
1 (n=8)	68,0 ±7,7	93,2 ±5,0	70,3 ±6,0	64,6 ±7,1
2 (n=8)	63,4 ±18,3	83,6 ±17,7	62,8 ±20,4	57,3 ±20,1
3 (n=8)	82,9 ±7,7	96,8±6,6	70,9 ±19,1	69,1 ±17,6
4 (n=8)	74,4 ±9,1	95,2 ±11,7	76,3 ±13,4	69,9 ±12,1
Média Total	**72,2 ±10,7**	**92,2 ±10,2**	**70,1 ±14,7**	**65,2 ±14,2**

MPI[1]: membrana plasmática intacta; MAI[2]: membrana acrossomal intacta, APM[3]: alto potencial de membrana mitocondrial e PIAIA[4]: células com membranas plasmática e acrossomal intactas e com alto potencial de membrana mitocondrial.

Tabela 4 - Médias ± desvios padrão das percentagens de alterações morfológicas no sêmen in natura dos garanhões, em oito colheitas de sêmen - Pirassununga –2006.

Alterações Morfológicas	Garanhão				
	1 (n=8)	**2** (n=8)	**3** (n=8)	**4** (n=8)	**Média**
DEFEITOS MAIORES (%)					
Acro[1]	3,0 ±1,5	1,4 ±1,4	2,3 ±1,3	0,7 ±0,5	1,8 ±1,2
GPP[2]	3,8 ±2,0	1,8 ±1,8	4,1 ±1,1	5,9 ±4,0	3,9 ±2,2
Csub[3]	0,0 ±0,0	0,1 ±0,2	0,2 ±0,5	0,1 ±0,2	0,1 ±0,2
CEC[4]	0,1 ±0,2	0,1 ±0,4	0,1 ±0,2	0,0 ±0,0	0,1 ±0,6
CIP[5]	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,1 ±0,4	0,5 ±0,6	0,2 ±0,2
BaEst[6]	0,7 ±1,4	0,2 ±0,4	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,2 ±0,4
Piri[7]	0,1 ±0,2	0,0 ±0,0	0,1 ±0,2	0,0 ±0,0	0,0 ±0,1
PeAn[8]	0,1 ±0,4	0,1 ±0,4	0,1 ±0,2	0,1 ±0,2	0,1 ±0,3
CoAn[9]	0,2 ±0,4	0,2 ±0,3	0,3 ±0,6	0,0 ±0,0	0,2 ±0,3
Pouch[10]	0,2 ±0,3	0,6 ±0,6	0,2 ±0,4	0,0 ±0,0	0,3 ±0,3
Terato[11]	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0
Interm[12]	3,9 ±1,9	2,4 ±1,5	4,5 ±2,4	29,6 ±8,4	10,1 ±3,5
CFDE[13]	1,9 ±1,8	1,5 ±0,8	1,0 ±0,8	1,4 ±0,7	1,5 ±1,0
CDGPD[14]	0,4 ±0,6	1,1 ±1,1	1,1 ±1,0	0,3 ±0,4	0,7 ±0,8
DM[15]	14,5 ±4,4	9,9 ±3,6	14,6 ±2,2	38,1 ±6,0	19,3 ±4,0
DEFEITOS MENORES (%)					
CGCLP[16]	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,1 ±0,2	0,1 ±0,2	0,0 ±0,1
CIN[17]	0,7±0,9	0,3 ±0,7	0,3 ±0,5	0,4 ±0,4	0,4 ±0,6
Retro[18]	0,1 ±0,2	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,0 ±0,05
CDE[19]	0,8 ±1,0	0,6 ±0,7	0,6 ±0,6	0,7 ±0,8	0,7 ±0,8
GPD[20]	0,6±0,4	0,8 ±0,7	2,3 ±1,1	1,0 ±0,8	1,2 ±0,7
Dmen[21]	2,1 ±2,0	1,8 ±1,1	3,3 ±1,7	2,6 ±1,5	12,0 ±1,6
TD[22]	**16,7 ±4,4**	**11,4 ±3,1**	**17,8 ±2,3**	**40,2 ±6,4**	**21,5 ±4,0**

Acro[1]: defeito de acrossoma; GPP[2]: presença de gota protoplasmática proximal; Csub[3]: cabeça subdesenvolvida; CEC[4]: cauda enrolada na cabeça; CIP[5]:cabeça isolada patológica; BaEst[6]: base da cabeça espermática estreita; Piri[7]: cabeça de formato piriforme; PeAn[8]: cabeça pequena e anormal; CoAn[9]: cabeça de contorno anormal; Pouch[10]: presença de *Pouch Formation*; Terato[11]: presença de formas teratológicas; Interm[12]: defeito de peça intermediária (fibrilação, fratura total e parcial, edema, pseudogota, outros); CFDE[13]: cauda fortemente dobrada ou enrolada; CDGPD[14]: cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa; DM[15]: total de defeitos maiores; CGCLP[16]: cabeça de tamanho gigante, curta, larga ou pequena normal; CIN[17]: cabeça isolada normal; Retro[18]: inserção retroaxial ou oblíqua da cauda na base da cabeça espermática; CDE[19]: cauda dobrada ou enrolada; GPD[20]: presença de gota protoplasmática distal; Dmen[21]: total de defeitos menores; TD[22]: total de defeitos (defeitos maiores + defeitos menores).

4.2. Avaliações pós-descongelação

Nas análises de variância não foram encontrados efeitos das interações entre as concentrações espermáticas e os volumes das palhetas (P>0,05); portanto, todas as análises estatísticas seguintes foram realizadas considerando os dois tratamentos individualmente. Neste texto, para melhor entendimento, serão abordadas primeiramente todas as variáveis estudadas sobre o plano da concentração e posteriormente sobre o volume.

Somente a título de informação, como já previsto durante o delineamento, algumas variáveis respostas apresentaram efeito do bloco (do garanhão), sendo elas: motilidade total computadorizada (MTCA), motilidade progressiva computadorizada (MPRO), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilinear (VCL), freqüência de batimento flagelar (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), espermatozóides com membranas plasmática e acrossomal intactas e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIC), defeito de acrossoma (Acro), gota protoplasmática proximal (GPP), cabeça isolada patológica (CIP), estreita na base (EstBa), piriforme (Piri), de contorno anormal (ContAn), formações *Pouch Formation*, defeito de peça intermediária, cabeça delgada (Cdel), gigante, curta, larga ou pequena normal (CGCLP), isolada normal (CIN), gota protoplasmática distal (GPD), total de defeitos maiores (DM) e defeitos totais (TD).

4.2.1. Efeito da concentração espermática

4.2.1.2. Avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA)

Os valores médios, desvios padrão e diferenças estatísticas de cada variável avaliada pelo CASA, nas concentrações estudadas, estão demonstradas na tabela 5.

Tabela 5 - Médias ± desvios padrão das características do movimento espermático avaliados pelo sistema CASA de sêmen eqüino congelado em três diferentes concentrações espermáticas - Pirassununga –2005.

Características do movimento espermático	Concentração ($x10^6$sptz./mL)		
	100	200	400
MTCA[1](%)	47,6 ±10,7[a]	38,4 ±12,2[b]	31,4 ±12,7[c]
MTPRO[2](%)	16,6 ±6,4[a]	10,9 ±6,1[b]	7,4 ±5,6[c]
ALH[3](µm)	5,1 ±0,4 [a]	4,6 ±0,5[b]	4,1 ±0,5[c]
BCF[4](Hz)	38,5 ±1,5[a]	35,4 ±1,9[b]	33,2 ±2,0[c]
LIN[5](%)	56,0 ±0,3[a]	54,2 ±0,4[b]	53,0 ±0,5[b]
STR[6](%)	84,2 ±0,3[a]	83,5 ±0,3[a]	83,2 ±0,4[a]
VSL[7](µm/s)	77,8 ±6,1[a]	65,5 ±8,4[b]	56,7 ±8,9[c]
VCL[8](µm/s)	154,8 ±12,2[a]	129,1 ±16,4[b]	110,4 ±17,6[c]

Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

MTCA[1]: motilidade total; MPRO[2]: motilidade progressiva; ALH[3]: deslocamento lateral da cabeça; BCF[4]: freqüência de batimento flagelar; LIN[5]: linearidade; STR[6]: retilinearidade; VSL[7]: velocidade progressiva; VCL[8]: velocidade curvilinear.

A média da motilidade total computadorizada (MTCA) foi diferente em cada concentração espermática (P<0,05), sendo maior no C100 (47,6 ±10,7%), menor no C400 (31,4 ±12,7 %) e de valor intermediário no C200 (38,4 ±12,2%).

A mesma situação foi observada na avaliação da motilidade progressiva computadorizada (MTPRO), no qual C100 apresentou maiores valores médios (16,6 ±6,4%),

seguido por C200 (10,9 ±6,1%) e os menores valores foram observados no C400 (7,4 ±5,6%) (P<0,05).

Seguindo o comportamento das motilidades acima descritas, o deslocamento lateral de cabeça (ALH) e a freqüência de batimento flagelar (BCF) diferiram entre as concentrações espermáticas estudadas (P<0,05), nos quais foram encontrados os maiores valores no C100 (5,1 ±0,4 µm e 38,5 ±1,5 Hz, respectivamente), os valores intermediários no C200 (4,6 ±0,5 µm e 35,4 ±1,9 Hz, respectivamente) e os menores valores no C400 (4,1 ±0,5 µm e 33,2 ±2,0 Hz, respectivamente).

Os valores médios da velocidade progressiva (VSL) e curvilinear (VCL) também foram maiores no C100 (77,8 ±6,1 e 154,8 ±12,2 µm/s, respectivamente), intermediários no C200 (65,5 ±8,4 e 129,1 ±16,4 µm/s, respectivamente) e menores no C400 (56,7 ±8,9 e 110,4 ±17,6 µm/s, respectivamente) (P<0,05).

Já os valor médio da linearidade (LIN) foi maior em C100 (54,2 ±0,3 %) que em C200 (53,0 ±0,4 %) e C400 (56,0 ±0,5 %), sendo igual entre os dois últimos grupos (P<0,05).

Quanto a retilinearidade (STR), foi observada igualdade estatística (P>0,05) entre C100 (84,2 ±0,3 %), C200 (83,5 ±0,3 %) e C400 (83,2 ±0,4 %).

4.2.1.3. Avaliação da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

As percentagens médias do total de membrana plasmática intacta (MPI), de membrana acrossomal intacta (MAI), de peças intermediárias com alto potencial de membrana

mitocondrial (APM) e das células identificadas com membranas plasmática e acrossomal intactas e com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), estão ilustradas na tabela 6.

Tabela 6 - Médias ± desvios padrão das percentagens de células espermáticas, classificadas de acordo com os resultados da microscopia de epifluorescência de sêmen congelado eqüino, em três diferentes concentrações espermáticas – Pirassununga – 2006.

Células	Concentração ($x10^6$sptzs/mL)		
	100	200	400
MPI[1] (%)	43,5 ±13,1 [a]	40,1 ±9,4 [b]	34,9 ±12,4 [c]
MAI[2] (%)	81,0 ±7,1 [a]	83,1 ±17,0 [a]	78,0 ±13,0 [a]
APM[3] (%)	46,6 ±11,0 [a]	41,3 ±16,4 [a]	36,5 ±13,0 [b]
PIAIA[4] (%)	38,4 ±15,0 [a]	38,4 ±9,6 [a]	35,2 ±11,0 [a]

Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

MPI[1]: membrana plasmática intacta; MAI[2]: membrana acrossomal intacta, APM[3]: alto potencial de membrana mitocondrial e PIAIA[4]: células com membranas plasmática e acrossomal intactas e com alto potencial de membrana mitocondrial.

A percentagem média de membrana plasmática intacta (MPI) diferiu entre as três concentrações estudadas, (P<0,05) sendo maior no tratamento C100 (43,5 ±13,1), seguida pelo tratamento C200 (40,1 ±9,4) e menor no C400 (34,9 ±12,4%).

Quanto à membrana acrossomal, as percentagens médias resultaram em igualdade estatística (P>0,05) entre os tratamentos C100, C200 e C400 (81,0 ±7,1%, 83,1 ±17,0% e 78,0 ±13,0%, respectivamente).

A quantidade média de células espermáticas com alto potencial de membrana mitocondrial não diferiu entre os tratamentos C100 (46,6 ±11,0%) e C200 (41,3 ±16,4%) (P>0,05) e foi menor no C400 (36,5 ±13,0%) (P<0,05).

No entanto, a percentagem média de células PIAIA foi igual nos três tratamentos C100 (38,4 ±15,0%), C200 (38,4 ±9,6%) e C400 (35,2 ±11,0%) (P>0,05).

4.2.1.4. Avaliação das Características Morfológicas

As percentagens médias das alterações morfológicas do sêmen congelado dos animais utilizados neste experimento, de acordo com as concentrações testadas, estão representadas na tabela 7.

Tabela 7 - Médias ± desvios padrão das percentagens de alterações morfológicas do sêmen eqüino congelado em três diferentes concentrações espermáticas – Pirassununga – 2006.

Alterações Morfológicas (%)	Concentrações ($x10^6$sptz/mL)		
	100	**200**	**400**
DEFEITOS MAIORES			
Acro[1]	2,33 ±0,19 [a]	1,99 ±0,19 [a]	2,23 ±0,20 [a]
GPP[2]	3,42 ±0,27 [a]	2,79 ±0,25 [a]	2,84 ±0,27 [a]
Csub[3]	0,03 ±0,01 [a]	0,02 ±0,02 [a]	0,00 ±0,00 [a]
CEC[4]	0,05 ±0,02 [a]	0,08 ±0,02 [a]	0,06 ±0,02 [a]
CIP[5]	0,18 ±0,05 [a]	0,17 ±0,02 [a]	0,15 ±0,04 [a]
BaEst[6]	0,06 ±0,03 [a]	0,07 ±0,02 [a]	0,05 ±0,02 [a]
Piri[7]	0,00 ±0,00 [a]	0,00 ±0,00 [a]	0,00 ±0,00 [a]
PeAn[8]	0,00 ±0,00 [a]	0,00 ±0,00 [a]	0,00 ±0,00 [a]
CoAn[9]	0,32 ±0,06 [a]	0,20 ±0,05 [a]	0,23 ±0,05 [a]
Pouch[10]	0,39 ±0,10 [a]	0,27 ±0,08 [a]	0,21 ±0,08 [a]
Terato[11]	0,00 ±0,00 [a]	0,00 ±0,00 [a]	0,00 ±0,00 [a]
Interm[12]	12,06 ±1,77 [a]	12,04 ±1,76 [a]	11,54 ±1,72 [a]
CFDE[13]	1,81 ±0,13 [a]	2,10 ±0,14 [a]	1,89 ±0,11 [a]
CDGPD[14]	2,10 ±0,78 [a]	1,14 ±0,18 [a]	0,98 ±0,19 [a]
DM[15]	22,30 ±1,72 [a]	21,42 ±1,63 [a]	20,12 ±1,65 [a]
DEFEITOS MENORES			
CGCLP[16]	0,15 ±0,05 [a]	0,12 ±0,04 [a]	0,15 ±0,02 [a]
CIN[17]	0,85 ±0,12 [a]	0,88 ±0,12 [a]	0,88 ±0,13 [a]
Retro[18]	0,09 ±0,03 [a]	0,03 ±0,02 [a]	0,02 ±0,01 [a]
CDE[19]	0,59 ±0,08 [a]	0,38 ±0,05 [b]	0,31 ±0,05 [b]
GPD[20]	0,92 ±0,13 [a]	0,74 ±0,11 [a]	0,56 ±0,09 [a]
Dmen[21]	3,40 ±0,83 [a]	2,25 ±0,18 [a]	2,07 ±0,22 [a]
TD[22]	**24,58 ±1,76** [a]	**23,67 ±1,62** [a]	**21,62 ±1,60** [a]

Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

Acro[1]: defeito de acrossoma; GPP[2]: presença de gota protoplasmática proximal; Csub[3]: cabeça subdesenvolvida; CEC[4]: cauda enrolada na cabeça; CIP[5]:cabeça isolada patológica; BaEst[6]: base da cabeça espermática estreita; Piri[7]: cabeça de formato piriforme; PeAn[8]: cabeça pequena e anormal; CoAn[9]: cabeça de contorno anormal; Pouch[10]: presença de Pouch Formation; Terato[11]: presença de formas teratológicas; Interm[12]: defeito de peça intermediária (fibrilação, fratura total e parcial, edema, pseudogota, outros); CFDE[13]: cauda fortemente dobrada ou enrolada; CDGPD[14]: cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa; DM[15]: total de defeitos espermáticos maiores; CGCLP[16]: cabeça espermática de tamanho gigante, curta, larga ou pequena normal; CIN[17]: cabeça isolada normal; Retro[18]: inserção retroaxial ou oblíqua da cauda na base da cabeça espermática; CDE[19]: cauda espermática dobrada ou enrolada; GPD[20]: presença de gota protoplasmática distal; Dmen[21]: total de defeitos espermáticos menores; TD[22]: total de defeitos espermáticos (defeitos maiores + defeitos menores).

Na tabela 7 é possível observar a interferência da concentração celular somente na percentagem média de cauda dobrada ou enrolada (CDE), a qual foi maior no grupo C100

(0,59 ±0,08%) (P<0,05) e menores e iguais entre si nos grupos C200 e C400 (P>0,05) (0,38 ±0,05% e 0,31 ±0,05%).

Todas as outras alterações morfológicas espermáticas avaliadas neste experimento não diferiram entre os tratamentos C100, C200 e C400 (P>0,05), sendo que as percentagens médias encontradas de espermatozóides pós–descongelação apresentando defeito de acrossoma (Acro) foram de 2,33 ±0,19, 1,99 ±0,19 e 2,23 ±0,20 %, respectivamente. A quantidade média de células espermáticas com presença de gota protoplasmática proximal (GPP) foi de 3,42 ±0,27; 2,79 ±0,25 e 2,84 ±0,27 %, cabeça subdesenvolvida (Csub) de 0,03 ±0,01; 0,02 ±0,02 e 0,00 ±0,00 %; cauda enrolada na cabeça (CEC) de 0,05 ±0,02; 0,08 ±0,02 e 0,06 ±0,02 %, cabeça isolada patológica (CIP) de 0,18 ±0,05, 0,17 ±0,02 e 0,15 ±0,04%, base da cabeça espermática estreita (BA Est) de 0,06 ±0,03, 0,07 ±0,02 e 0,05 ±0,02 %, cabeça de formato piriforme (Piri), cabeça pequena e anormal (PeAn) e formas teratológicas (Terato) de 0,00 ±0,00 nas três concentrações, cabeça de contorno anormal de 0,32 ±0,06, 0,20 ±0,05 e 0,23 ±0,05 %, presença de *Pouch Formation* (Pouch) de 0,39 ±0,10, 0,27 ±0,08 e 0,21 ±0,08 %, defeito de peça intermediária (Interm) de 12,06 ±1,77, 12,04 ±1,76 e 11,54 ±1,72 %, cauda fortemente dobrada ou enrolada (CFDE) de 1,81 ±0,13, 2,10 ±0,14 e 1,89 ±0,11 %, cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa (CDGPD) de 1,10 ±0,78, 1014 ±0,18 e 0,98 ±0,19 %, resultando no total de defeitos maiores de 22,30 ±1,72, 21,42 ±1,63 e 20,12 ±1,65 % nas concentrações C100, C200 e C400, respectivamente.

Já quanto aos defeitos menores, os valores médios encontrados em cabeça espermática de tamanho gigante, curta, larga ou pequena normal (CGCLP) foram de 0,15 ±0,05, 0,12 ±0,04 e 0,15 ±0,02 %, em cabeça isolada normal (CIN) de 0,85 ±0,12, 0,88 ±0,12 e 0,88 ±0,13 %, em inserção retroaxial ou oblíqua da cauda na base da cabeça espermática (Retro) de 0,09 ±0,03, 0,03 ±0,02 e 0,02 ±0,01 %, em presença de gota protoplasmática distal (GPD) de 0,92 ±0,13, 0,74 ±0,11 e 0,56 ±0,09 %, resultando no total de defeitos menores (Dmen) de

3,40 ±0,83, 2,25 ±0,18 e 2,07 ±0,22 % nas concentrações C100, C200 e C400, respectivamente.

Assim, as médias encontradas de total de defeitos espermáticos (TD) foi de 24,58 ±1,76 % para C100, 23,67 ±1,62 % para C200 e de 21,62 ±1,60 para C400.

4.2.2. Efeito do volume da palheta

4.2.2.1. Avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA)

As médias das características do movimento espermático computadorizado, de acordo com os volumes estudados, estão demonstradas na tabela 8.

Tabela 8 - Médias ± desvios padrão das características do movimento espermático avaliados pelo sistema CASA de sêmen eqüino congelado em palhetas francesas de 0,50 mL e 0,25 mL - Pirassununga –2006.

Características do movimento espermático	**Volume da palheta (mL)**	
	0,50	**0,25**
MTCA[1](%)	40,0 ±14,1 [a]	38,4 ±13,2 [a]
MTPRO[2](%)	11,3 ±7,6 [a]	12,0 ±6,7 [a]
ALH[3](µm)	4,5 ±0,6 [a]	4,6 ±0,7 [a]
BCF[4](Hz)	35,8 ±0,8 [a]	35,5 ±2,9 [a]
LIN[5](%)	84,3 ±0,3 [a]	82,9 ±0,2 [a]
STR[6](%)	54,7 ±0,3[a]	53,6 ±0,4[b]
VSL[7](µm/s)	65,9 ±12,0 [a]	67,1 ±11,3 [a]
VCL[8](µm/s)	128,6 ±24,8[b]	133,7 ±22,9[a]

Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

MTCA[1]: motilidade total; MPRO[2]: motilidade progressiva; ALH[3]: deslocamento lateral da cabeça; BCF[4]: freqüência de batimento flagelar; LIN[5]: linearidade; STR[6]: retilinearidade; VSL[7]: velocidade progressiva; VCL[8]: velocidade curvilinear.

Conforme observadas na tabela 8, as motilidades espermáticas computadorizadas não diferiram entre os dois volumes estudados (P>0,05), sendo a percentagem média (± desvio padrão) da motilidade total (MTCA) de 39,92 (±14.1) para a congelação utilizando palheta de 0,50 mL e 38,41 (±13.2) para palheta de 0,25 mL e da motilidade progressiva (MTPRO) de 11,30 (±7.55) na palheta de 0,50 mL e 11,97 (±6.71)% na palheta de 0,25 mL.

Igualdades entre as palhetas de 0,50 mL e 0,25 mL (P>0,05) também foram encontradas nas variáveis deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH), na qual as médias (± desvio padrão) encontradas foram 4,5 (±0,64) e 4,6 (±0,69) µm, respectivamente, na freqüência de batimento flagelar (BCF), com valores médios (± desvio padrão) de 35,8 (±2,8) e 35,5 (±2,9) Hz, respectivamente e na linearidade (LIN), cujas médias percentuais (±

desvio padrão) foram 54,7 (±0,34) % em palhetas de 0,50 mL e 53,6 (±0,39) % nas palhetas de 0,25 mL.

Já na variável retilinearidade (STR) foi encontrada diferença entre os dois volumes de armazenamento estudados (P<0,05), sendo que a palheta de 0,50 mL proporcionou maior percentagem média (84,3 ±0,29) que a palheta de 0,25 mL (82,9 ±0,22 %).

Quanto às velocidades espermáticas avaliadas neste experimento, a análise estatística indicou não haver diferença entre os volumes da palheta estudados para a velocidade progressiva (VSL) (P>0,05), cujas médias (± desvio padrão) foram de 65,9 (±11,98) para a palheta de 0,50 mL e de 67,1 (±11,34) µm/s para a palheta de 0,25 mL, enquanto que a média das velocidades curvilinear espermática (VCL) foi maior no armazenamento em 0,25 mL (133,71 ±22,9) que em 0,50 mL (128,56 ±24,8) µm/s (P<0,05).

4.2.2.3. Avaliação das Membranas Plasmática, Acrossomal e Mitocondrial

Quanto às integridades das membranas espermáticas, todas as avaliações realizadas neste experimento não resultaram em diferença estatística em relação aos volumes testados (Tabela 9).

Tabela 9 - Médias ± desvios padrão das percentagens de células espermáticas, classificadas de acordo com os resultados da microscopia de epifluorescência de sêmen eqüino congelado em palhetas francesas de 0,50 e 0,25 mL – Pirassununga – 2006.

Células	**Volume da palheta (mL)**	
	0,50	**0,25**
MPI[1] (%)	40,7 ±11,1 [a]	38,6 ±3,1 [a]
MAI[2] (%)	82,4 ±7,6 [a]	79,3 ±16,3 [a]
APM[3] (%)	41,2 ±13,1 [a]	38,1 ±14,2 [a]
PIAIA[4] (%)	37,8 ±12,2 [a]	36,9 ±12,1 [a]

Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

MPI[1]: membrana plasmática intacta; MAI[2]: membrana acrossomal intacta, APM[3]: alto potencial de membrana mitocondrial e PIAIA[4]: células com membranas plasmática e acrossomal intactas e com alto potencial de membrana mitocondrial.

Não foi observada diferença entre as médias das percentagens de células com membrana plasmática intacta (MPI) nas palhetas de 0,50 mL e 0,25 mL (P>0,05), cujas percentagens médias encontradas (±desvio padrão) foram de 40,6 (±11,1) para o volume de 0,50 ml e de 38,5 (±13,1) % para o volume de 0,25 mL. Da mesma maneira, a percentagem média de espermatozóides com membrana acrossomal intacta (MAI) não variou entre a palheta de 0,50 mL (82,4 ±7,5 %) e 0,25 mL (79,3 ±16,3 %) (P>0,05). A percentagem média de células espermáticas com peça intermediária composta por mitocôndrias de alto potencial mitocondrial (APM) também mantiveram-se iguais entre os volumes de 0,50 mL (41,2 ±13,1 %) e 0,25 mL (38,1 ±14,1 %) (P >0,05).

Como conseqüência, a percentagem média da categoria de células espermáticas com, concomitantemente, membranas plasmática e acrossomal intactas e com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA) não diferiu em relação aos volumes de armazenamento de 0,50 mL, cujo valor médio encontrado (± desvio padrão) foi de 37,8 (±12,15 %) e de 0,25 mL, de valor médio de 36,9 (±12,06 %) (P>0,05).

4.2.2.4. Avaliação das Características Morfológicas

Na tabela 10 estão apresentadas as percentagens médias, desvios padrão e diferenças estatísticas dos defeitos morfológicos avaliados por microscopia de contraste de interferência diferencial em palhetas de 0,50 e 0,25 mL.

Tabela 10 - Médias ± desvios padrão das percentagens de alterações morfológicas do sêmen eqüino congelado em palhetas francesas de 0,50 e 0,25 mL – Pirassununga – 2006.

Alterações Morfológicas (%)	**Volume da palheta (mL)**	
	0,50	**0,25**
DEFEITOS MAIORES		
Acro[1]	2,12 ±0,15 [a]	2,24 ±0,17 [a]
GPP[2]	3,06 ±0,21 [a]	2,96 ±0,22 [a]
Csub[3]	0,01 ±0,01 [a]	0,02 ±0,01 [a]
CEC[4]	0,05 ±0,02 [a]	0,07 ±0,02 [a]
CIP[5]	0,21 ±0,04[a]	0,12 ±0,03[b]
BaEst[6]	0,05 ±0,02 [a]	0,07 ±0,02 [a]
Piri[7]	0,00 ±0,00 [a]	0,00 ±0,00 [a]
PeAn[8]	0,00 ±0,00 [a]	0,00 ±0,00 [a]
CoAn[9]	0,21 ±0,03 [a]	0,29 ±0,05 [a]
Pouch[10]	0,27 ±0,07 [a]	0,31 ±0,07 [a]
Terato[11]	0,07 ±0,02 [a]	0,48 ±0,42 [a]
Interm[12]	11,76 ±1,37 [a]	12,01 ±1,48 [a]
CFDE[13]	1,91 ±0,12 [a]	1,96 ±0,11 [a]
CDGPD[14]	1,72 ±0,53 [a]	1,09 ±0,13 [a]
DM[15]	21,23 ±1,31 [a]	21,30 ±1,42 [a]
DEFEITOS MENORES		
CGCLP[16]	0,12 ±0,03 [a]	0,10 ±0,03 [a]
CIN[17]	1,06 ±0,11[a]	0,66 ±0,09[b]
Retro[18]	0,04 ±0,01 [a]	0,06 ±0,02 [a]
CDE[19]	0,37 ±0,04 [a]	0,48 ±0,06 [a]
GPD[20]	0,78 ±0,09 [a]	0,69 ±0,10 [a]
Dmen[21]	2,39 ±0,16 [a]	2,74 ±0,57 [a]
TD[22]	**23,62 ±1,1** [a]	**22,90 ±1,40** [a]

Letras diferentes numa mesma linha indicam diferença estatística (P<0,05).

Acro[1]: defeito de acrossoma; GPP[2]: presença de gota protoplasmática proximal; Csub[3]: cabeça subdesenvolvida; CEC[4]: cauda enrolada na cabeça; CIP[5]:cabeça isolada patológica; BaEst[6]: base da cabeça espermática estreita; Piri[7]: cabeça de formato piriforme; PeAn[8]: cabeça pequena e anormal; CoAn[9]: cabeça de contorno anormal; Pouch[10]: presença de Pouch Formation; Terato[11]: presença de formas teratológicas; Interm[12]: defeito de peça intermediária (fibrilação, fratura total e parcial, edema, pseudogota, outros); CFDE[13]: cauda fortemente dobrada ou enrolada; CDGPD[14]: cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa; DM[15]: total de defeitos espermáticos maiores; CGCLP[16]: cabeça espermática de tamanho gigante, curta, larga ou pequena normal; CIN[17]: cabeça isolada normal; Retro[18]: inserção retroaxial ou oblíqua da cauda na base da cabeça espermática; CDE[19]: cauda espermática dobrada ou enrolada; GPD[20]: presença de gota protoplasmática distal; Dmen[21]: total de defeitos espermáticos menores; TD[22]: total de defeitos espermáticos (defeitos maiores + defeitos menores).

Dentre os defeitos maiores, observa-se que a forma de armazenamento somente afetou a percentagem média de células com cabeça isolada patológica (CIP) (P<0,05), cujo valor

médio maior encontrado foi de 0,21 ±0,04 %, nas palhetas de 0,50 mL, e menor de 0,12 ±0,03 %, nas de 0,25 mL.

Todos os outros defeitos maiores foram iguais para os dois volumes (0,50 mL e 0,25 mL) (P>0,05). Para os defeitos maiores de cabeça foram encontradas, as respectivas médias de 2,12 ±0,15 e 2,24 ±0,17 % de defeitos de acrossoma (Acro), 3,06 ±0,21 e 2,96 ±0,22 % de células apresentando gota protoplasmática proximal (GPP), 0,01 ±0,01 e 0,02 ±0,01 % de cabeças espermáticas subdesenvolvidas (Sub), 0,05 ±0,02 e 0,07 ±0,02 % de espermatozóides com cauda enrolada na cabeça (CEC), 0,21 ±0,04 e 0,12 ±0,03 % de cabeças espermáticas isoladas e patológicas (CIP), 0,05 ±0,02 e 0,07 ±0,02 % de cabeças espermáticas com base estreita (BaEst), 0,21 ±0,03 e 0,29 ±0,05 % de cabeça de contorno anormal (CoAn), 0,27 ±0,07 e 0,31 ±0,07 % de espermatozóides com presença de *Pouch Formation* ou vacúolos na cabeça (Pouch) e 0,0 ±0,0 % de células espermáticas com cabeça piriforme (Piri), cabeça pequena e anormal (PeAn) e formas teratológicas em ambos os volumes.

A percentagem média encontrada de defeitos de peça intermediária (Interm) nas palhetas de 0,50 mL foi de 11,76 ±1,37 e na palheta de 0,25 mL, 12,01 ±1,48 %. A quantidade média de células espermáticas com presença de gota protoplasmática proximal (GPP) em 0,50 mL foi de 3,06 ±0,21 e em 0,25 mL foi de 2,96 ±0,22 %. A percentagem média de células com cauda enrolada na cabeça (CEC) foi de 0,05 ±0,02 no volume de 0,50 mL e de 0,07 ±0,02 % em 0,25 mL. Já para a variável defeito de cauda fortemente dobrada ou enrolada (CFDE), foram encontrados os valores médios de 1,91 ±0,12 e 1,96 ±0,11 %, respectivamente e para cauda dobrada com gota protoplasmática distal anexa (CDGPD), as percentagens médias encontradas foram de 1,72 ±0,53 em 0,50 mL e de 1,09 ±0,13 % em palhetas de 0,25 mL.

Ainda, as percentagens médias dos defeitos espermáticos menores também não apresentaram diferenças entre os volumes de armazenamento estudados ((P>0,05), com

exceção de cabeça isolada normal, que foi maior nas amostras congeladas em palhetas de 0,50 mL (1,06 ±0,11 %) que em palhetas de 0,25 mL (0,66 ±0,09 %) (P<0,05).

As médias da patologia de cabeça espermática delgada (Cdel) resultaram no valor 0,0 ±0,0 % em ambas as palhetas testadas, enquanto que no defeito de cabeça espermática gigante, curta, larga ou pequena normal (CGCLP) foram observadas médias de 0,12 ±0,03 nas palhetas de 0,50 mL e de 0,10 ±0,03 % nas de 0,25 mL.

Quanto às percentagens médias de defeitos menores de cauda espermática nos respectivos volumes de 0,50 mL e 0,25 mL, foram observados 0,04 ±0,01 e 0,06 ±0,02 % de inserção retroaxial (Retro), 0,37 ±0,04 e 0,48 ±0,06 % de cauda dobrada ou enrolada (CDE), e 0,78 ±0,09 e 0,69 ±0,10 % de presença de gota protoplasmática distal (GPD).

Por fim, as percentagens médias de defeitos espermáticos maiores (DM - 21,23 ±1,31 e 21,30 ±1,42 %) e menores (Dmen -2,39 ±0,16 e 2,74 ±0,57 %) não diferiram entre os volumes de armazenamento 0,50 mL e 0,25 mL (P>0,05), respectivamente. Logo, não houve diferença estatística entre os volumes em questão (P>0,05) quanto a defeitos espermáticos totais (TD – 23,62 ±1,31 e 22,90 ±1,40 %, respectivamente).

dev

5. DISCUSSÃO

Das avaliações do sêmen *in natura*, todos os garanhões apresentaram volume seminal *free gel*, concentração, motilidade total e morfologia espermáticas dentro dos valores médios encontrados para a espécie, segundo Pickett et al. (1987) e Medina (2004). Distingue-se o animal número 4 pelo menor volume seminal médio e maior percentagem de defeitos maiores, em evidência o defeito de peça intermediária. Isto se deve a idade avançada do garanhão, mas tais características seminais ainda encontram-se dentro dos valores aceitáveis para fertilização e congelação do sêmen.

Quanto à avaliação da qualidade seminal pós-descongelação nos tratamentos aqui testados, a ausência de interações entre o volume de armazenamento e a concentração espermática indica a independência de efeitos destes tratamentos, ou seja, cada concentração espermática utilizada neste experimento resulta em uma mesma qualidade seminal nos dois volumes de armazenamento e cada um destes volumes proporciona características seminais semelhantes nas três concentrações.

É evidente a influência da concentração espermática na maioria das características de movimento espermático deste experimento, no qual houve uma diminuição nos valores das variáveis em questão com o aumento da concentração espermática, com exceção somente da retilinearidade, que se manteve entre as três concentrações e da linearidade, que foi superior somente na C100.

Dentre as características do movimento aqui avaliadas, não é desejável no sêmen pós-descongelado altos valores de deslocamento lateral de cabeça, pois este movimento despende energia da célula desnecessariamente no momento de deslocamento no trato feminino. Todas as outras variáveis da cinética espermática aqui avaliadas contribuem para o deslocamento espermático no trato feminino (ARRUDA, 2000), importante para que ocorra o encontro dos gametas masculino e feminino.

Assim sendo, quanto às características de movimentação espermática, de maneira geral, deduz-se que C100 resulta em melhor qualidade seminal que C200, e esta resulta em melhor qualidade seminal que C400.

Corroboram com este resultado, Loomis e Clark (1998) que, comparando as motilidades total e progressiva pelo sistema CASA de amostras de sêmen eqüino congeladas em palhetas de 0,50 mL nas concentrações espermáticas de 200, 400 e 800 x 10^6 sptz/mL, encontraram maior percentagem média dessas motilidades na concentração de 200, seguida por 400 e os valores menores observados na concentração de 800 x 10^6 sptz/mL. Sugere-se, então, que há um limite da concentração espermática do sêmen eqüino para criopreservação de 200 a 400 x 10^6 sptz/mL, na palheta de 0,50 mL.

Crockett et al (2001), procurando o melhor protocolo para criopreservar sêmen equino após resfriamento por 2,5 ou 24 horas, encontraram maior motilidade progressiva pós-descongelação, examinada pelo sistema CASA, em amostras preservadas nas concentrações espermáticas de 40 e 200 x 10^6 sptz/mL (25 e 23 %, respectivamente) que naquelas armazenadas em 400 x 10^6 sptz/mL (17 %), compartilhando a idéia de melhor qualidade seminal pós-descongelação nas menores concentrações espermáticas. O objetivo dos autores foi avaliar a melhor concentração espermática para o transporte do sêmen resfriado equino (50, 250 e 500 x 10^6 sptz/mL) para posterior criopreservação. Mas pode-se extrapolar para uma possível influência da concentração espermática utilizada na congelação, já que esta não foi mantida igualmente após a adição do meio para congelação.

No entanto, Angola et al. (1992) encontraram médias de motilidade espermática total visual maiores no sêmen equino congelado em 800 x 10^6 sptz/mL (47,48 ±6,22%) que no congelado com 100 x 10^6 sptz/mL (27,51 ±1,79%), tanto nas amostras armazenadas em 4 mL quanto em 0,50 mL. Mas os próprios autores indagam a possibilidade de erro de observação, já que os campos de leitura das amostras mais concentradas resultaram em maior número de

espermatozóides, o que pode aparentar maior número de células móveis que as amostras menos concentradas. É relevante salientar a importância da análise computadorizada do movimento espermático, utilizada neste experimento; esta tecnologia descarta qualquer erro humano durante a avaliação, pois cada célula espermática é examinada individualmente pelo sistema computacional (VERSTEGEN et al., 2002).

Ainda, Arruda et al (1993b), utilizando duas concentrações espermáticas distintas em palhetas de 0,50 mL (500 e 1000 x 10^6 sptz/mL) não encontraram diferença estatística entre estas duas concentrações na motilidade progressiva visual. Esta divergência de resultados pode ser devido à subjetividade do exame visual, realizado pelos autores em contrapartida ao exame computacional utilizado neste experimento, cuja acurácia é extremamente maior; Graham, em 1996, afirmou que o valor da motilidade espermática visual pós-descongelação como preditor da fertilidade é questionável, pois coeficientes de correlação entre motilidade visual e taxa de prenhez são baixos.

Entretanto Blanes et al. (2005), avaliando as motilidades total e progressiva, pelo sistema computadorizado, de amostras de sêmen eqüino congelado em palhetas de 0,50 mL nas concentrações espermáticas de 100, 200, 300 e 400 x 10^6 sptz/mL, também não encontraram diferença entre as concentrações, sendo os valores encontrados para motilidade total de 57,3; 59,2; 61,2; 57,1 % e para motilidade progressiva de 22,8; 22,8; 22,3 e 22,0 %, respectivamente. A discordância quanto à influência da concentração espermática neste experimento pode ser devido à diferença no tempo de resfriamento instituído, pois os mesmos autores afirmam haver diferença na qualidade seminal pós-descongelação entre diferentes tempos de estabilização, quando da utilização do Botu-Crio. Os autores utilizaram vinte minutos de estabilização em geladeira, enquanto que as amostras deste experimento foram submetidas ao resfriamento automatizado por 80 minutos, em média. As médias das motilidades nas concentrações 100, 200 e 400 x 10^6 sptz/mL encontradas pelos autores são

maiores que as deste experimento; uma diferença no s*etup* do CASA utilizado ou no meio para diluição do sêmen pós-descongelado podem ocasionar resultados de qualidade de movimento espermático distintos, além da possibilidade dos autores terem trabalhado com animais que apresentaram melhor qualidade seminal pó-descongelação. Contudo, estes fatores não influenciariam nos resultados estatísticos, pois o s*etup* e o meio para diluição do sêmen foram mantidos para todos os tratamentos, além do delineamento em blocos generalizados, utilizado por este experimento, para eliminar qualquer influência do indivíduo.

O mesmo ocorreu com os resultados de Heitland et al. (1996), nos quais houve igualdade nas motilidades total e progressiva (CASA) entre amostras de sêmen eqüino congeladas em palhetas de 0,50 mL, nas concentrações 20 x 10^6 sptz/mL (51 e 41 %), 200 x 10^6 sptz/mL (52 e 44 %) e 400 x 10^6 sptz/mL (50 e 43 %, respectivamente) e somente diminuição dessas motilidades quando a concentração espermática foi elevada a 800 x 10^6 sptz/mL (41 e 35 %) e 1.600 x 10^6 sptz/mL (32 e 27 %, respectivamente). Estes autores utilizaram curva de resfriamento mais rápida (-0,70°C/min) que a deste experimento (-0,25°C/min), o que pode ter acarretado na divergência de resultados entre os experimentos.

Outra descrição relevante da célula espermática, neste trabalho, foi a avaliação das integridades de membranas plasmática e acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial nos tratamentos testados. Já foi descrita anteriormente a importância de cada uma dessas estruturas se manterem íntegras pós-descongelação para o sucesso da inseminação artificial. O comportamento das membranas espermáticas pode ser considerado um reflexo da condição fisiológica ou patológica do macho, mas também torna-se uma mensuração da interação do homem com o sêmen quando este é coletado, processado, preservado e inseminado (SAACKE, 1983).

Neste experimento, a concentração espermática alterou a percentagem média de membrana plasmática intacta (MPI), fortalecendo o pensamento de que menores

concentrações proporcionam melhor qualidade pós-descongelação. Crockett et al. (2001), no mesmo trabalho já citado anteriormente sobre o melhor protocolo de resfriamento e posterior criopreservação do sêmen eqüino, encontraram maior percentagem de células espermáticas com membrana plasmática intacta nas amostras congeladas na concentração de 40 x 10^6 sptz/mL (60 %), seguida por 200 x 10^6 sptz/mL (53 %) e, por último, 400 x 10^6 sptz/mL (45 %).

Entretanto, Blanes et al. (2005) encontraram valores percentuais semelhantes de membrana plasmática intacta em amostras de sêmen eqüino congeladas em palhetas de 0,50 mL nas concentrações 100, 200, 300 e 400 x 10^6 sptz móveis pré-congelação/mL. Como já referido na discussão das características do movimento espermático, tal divergência de resultados pode ser devido à diferença das curvas de resfriamento empregadas em cada experimento ou uma possível diferença na técnica de avaliação desta membrana.

Já a percentagem de membrana acrossomal intacta (MAI) não foi alterada pelo aumento da concentração espermática. Este achado possibilita pressupor que a membrana acrossomal é uma estrutura relativamente resistente quando comparada à membrana plasmática; os próprios valores encontrados de integridade das membranas acusam tal afirmação, pois em todas as concentrações testadas a percentagem de membrana acrossomal intacta foi maior que a plasmática. Este estudo do comportamento da membrana acrossomal do espermatozóide eqüino pós-descongelação em diferentes concentrações espermáticas, avaliado por sonda fluorescente, tem significativa importância, pois ainda não havia sido realizado, apesar da técnica ser de fácil manipulação, como citado por Celeghini (2005) e eficaz, como comprovado por Souza (2001).

Quanto ao potencial de membrana mitocondrial, foi observada menor percentagem média de células espermáticas com alto potencial na maior concentração testada (C400), enquanto que C100 e C200 preservaram as células com mitocôndrias funcionais igualmente.

Isto leva a deduzir que o aumento na concentração espermática pode interferir no funcionamento mitocondrial, mas deve haver um limiar de concentração espermática para se preservar maior quantidade da organela. Como na avaliação da integridade da membrana acrossomal, acima discutida, é conveniente salientar a importância do estudo do potencial de membrana mitocondrial nas diferentes concentrações espermáticas aqui realizado, pois também ainda não havia sido desenvolvido, apesar da facilidade da manipulação da técnica e da relevância da mitocôndria funcional na produção de ATP para o deslocamento espermático.

As diferenças nas percentagens médias de espermatozóides com membranas íntegras ou funcionais, encontradas neste experimento, parecem coincidir com a hipótese de Parks e Graham (1992), que sugeriram uma diferença na resistência à congelação entre os compartimentos espermáticos, já que observaram diferenças na distribuição de lipídeos e proteínas entre a região periacrossomal e pós-acrossomal da cabeça, peça intermediária e peça principal.

Entretanto, das avaliações de membranas espermáticas pela microscopia de epifluorescência realizadas neste experimento, a de maior importância em termos de potencial de fertilidade do espermatozóide, é a categoria de células que apresentam concomitantemente integridade das membranas plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial, aqui denominadas PIAIA, exame este ainda não refeito por outros autores com tal finalidade. Sendo assim, as concentrações utilizadas neste experimento não causaram alterações entre si nesta categoria celular, ao que permite utilizá-las indiferentemente quanto à integridade das membranas espermáticas.

Apesar da motilidade espermática ter uma correlação significativa e positiva com percentagem de espermatozóides com membrana plasmática intacta (CASEY et al., 1993; DELL`AQUA, 2001) e com alto potencial de membrana mitocondrial (CASEY et al., 1993;

MARTINEZ-PASTOR et al., 2004), neste experimento os tratamentos afetaram a grande maioria das variáveis da cinética espermática, mas não a integridade das membranas espermáticas. Tem-se, então, que possivelmente haja outros fatores na estrutura desta célula que interfira na qualidade do seu deslocamento, além das membranas plasmática e das mitocôndrias funcionantes, como, por exemplo, a estrutura flagelar.

Keates, em 1980, descreveu que crioprotetores, como o glicerol, alteram a polimerização e despolimerização de microtubos do citoesqueleto. Dessa forma, a estrutura flagelar do espermatozóide possivelmente também é afetada por agentes crioprotetores, já que é composto por nove microtúbulos duplos periféricos e dois microtúbulos centrais (EDDY; O`BRIEN, 1994).

A morfologia espermática avaliada por DIC não foi alterada entre as concentrações C100, C200 e C400, somente o defeito de cauda dobrada ou enrolada (CDE) foi maior em C100. Este resultado ocorreu possivelmente ao acaso, uma vez que o número de células analisadas foi de apenas duzentas.

É interessante salientar neste experimento a diferença na percentagem média de células com acrossomo lesado identificadas pela técnica de microscopia de epifluorescência e de contraste de interferência diferencial, na qual observa-se facilmente a maior acurácia da primeira em relação à segunda, como já descrito por Souza (2001).

Quanto a qualidade seminal nos volumes de armazenamento examinados, a palheta de 0,50 mL apresentou maior valor médio que 0,25 mL somente na variável retilinearidade (STR), enquanto que a velocidade curvilinear (VCL) foi maior em 0,25 que em 0,50 mL quanto às avaliações do movimento espermático pelo sistema computadorizado (CASA). Todas as outras informações advindas desta tecnologia sugerem uma igualdade na qualidade seminal pós-descongelação no armazenamento em palhetas de 0,50 e 0,25 mL.

Papa e Dell'Aqua (2001), comparando resultados laboratoriais de sêmen criopreservado eqüino, armazenado em palhetas de 0,50 e 0,25 mL, encontraram melhores resultados da utilização das palhetas de 0,25 mL. No entanto, quanto aos resultados de fertilidade, a melhor taxa de prenhez foi observada no grupo de éguas inseminadas pré e pós-ovulação com sêmen envasado em 0,50 mL (50%) em relação ao grupo inseminado com palhetas de 0,25 mL (20%). Neste experimento, os resultados de qualidade de movimento espermático motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade do trajeto (µm/s), velocidade curvilinear (µm/s), velocidade progressiva (µm/s) e retilinearidade (%) não diferiram entre as duas formas de armazenamento.

Já Nothling e Shuttleworth (2005), examinando sêmen canino pós-descongelado afirmam encontrar maior motilidade total visual em amostras armazenadas em palhetas de 0,50 mL que em 0,25 mL. Os autores utilizaram vinte minutos como tempo de estabilização da célula; é possível que o tempo de estabilização utilizado possa ter acarretado o resultado disperso deste experimento, cujo período de estabilização foi em torno de oitenta minutos. Ainda, pode haver o efeito da espécie, além do fator da subjetividade do exame visual utilizado pelos autores.

A respeito da integridade das membranas espermáticas e habilidade funcional mitocondrial do sêmen congelado nas palhetas aqui verificadas, observou-se, de modo geral, uma igualdade na preservação destes componentes celulares, sendo possível supor que a congelação em palhetas de 0,5 e 0,25 mL resulta em espermatozóides pós-descongelação com as mesmas qualidades de membranas espermáticas. Assim, pode-se entender que a diminuição do volume da palheta e conseqüente maior homogeneidade na distribuição da temperatura entre os espermatozóides não influencia na integridade das membranas espermáticas.

Entretanto, Papa e Dell'Aqua (2001) avaliaram a integridade da membrana plasmática de sêmen eqüino pós-descongelado, por microscopia de epifluorescência e teste

hiposmótico, e encontraram melhores resultados no armazenamento em palhetas de 0,25 mL. Tais diferenças observadas em relação a este experimento, provavelmente, se deve à diferente técnica de congelação e de avaliação da integridade da membrana plasmática.

Dentro das morfologias espermáticas, somente houve uma superioridade na qualidade seminal da palheta de 0,25 mL em relação à 0,50 mL na percentagem de células com cabeça isolada, tanto normal quanto patológica. Entretanto, o valor médio de tais alterações morfológicas foi considerado baixo individualmente na palheta de 0,50 mL, não sendo um fator limitante para fertilização. Em adição, quando avaliado o total de defeitos (maiores, menores e totais) a igualdade entre os volumes mantiveram-se, o que leva a deduzir que se pode utilizar o armazenamento em palhetas de 0,25 e 0,50 mL indiscriminadamente quanto ao resultado de morfologia espermática pós-descongelação do sêmen eqüino.

Tem-se, então, pelos resultados deste experimento e pelas técnicas de congelação e avaliação seminal aqui utilizadas, que a qualidade seminal pós-descongelação está diretamente relacionada com a quantidade de agentes crioprotetores por unidade celular, ou seja, com a proporção crioprotetor/espermatozóide, independentemente do volume da palheta utilizado (0,50 ou 0,25 mL). Durante a congelação, os espermatozóides são direcionados para canais de soluções não congeladas entre os cristais de gelo e estes canais tornam-se progressivamente mais estreitos com a diminuição da temperatura (MAZUR, 1985). Tais canais são importantes durante a criopreservação, pois Amann e Pickett (1987) afirmaram que se 15% da água extracelular é mantida não-congelada, a possibilidade de sobrevivência da célula à congelação é maior. Esta informação, juntamente com a de que alguns agentes crioprotetores possuem a propriedade de diminuir a concentração de sal e elevar a percentagem de água não congelada extracelular, em temperaturas de –12°C (MAZUR, 1985), embasam os resultados deste experimento. Possivelmente, os espermatozóides das amostras congeladas em C100 dispunham de maior proporção de agentes crioprotetores que

as amostras congeladas em C200 e estas maior proporção que em C400. Quanto maior a quantidade de moléculas crioprotetoras por célula, maior a percentagem de canais de água não-congelada, ocasionando melhor qualidade seminal pós-descongelação.

6. CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados deste experimento, conclui-se que a qualidade seminal eqüina pós-descongelação é influenciada pela concentração espermática, de maneira que há diminuição gradativa nesta qualidade com o aumento gradativo da concentração (de 100 para 200 e de 200 para 400 x 10^6 espermatozóides /mL), independentemente do volume da palheta utilizado (0,50 ou 0,25 mL).

Tem-se, ainda, que a qualidade seminal deste mesmo sêmen é semelhante quando armazenado em palhetas de 0,25 ou de 0,50 mL, independentemente se a concentração espermática é de 100, 200, ou 400 x 10^6 de espematozóides /mL.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAS, A.P.; PINTO, da S.P. Regionalization of transmembrane glycoproteins in the plasma membrane of boar sperm head is revealed by fracture-label. ***J. Cell. Biol***., v. 97, p. 1356-1364, 1983.

ALBERTS, B.; DENNIS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Geração de energia em mitocôndrias e cloroplastos. In: Fundamentos da biologia Celular. Uma introdução à biologia molecular da célula. Porto Alegre; Artmed. 3°ed., p.417-456. 1999.

ALVARENGA, M.A.; LANDIM E ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; CESARINO, M.M. utilization of ethylene glycol as a cryoprotector for equine semen. ***Society for Theriogenology. Proceedings for annual Meeting***, Baltimore, 1998, p.155.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model sublethal cryodamage to human sperm duringcryopreservation. ***Journal of Andrology***, v.13, p. 232-241, 1992.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. ***Jounal of Equine Veterinary Science***, v. 7, p. 145-173, 1987.

ANGOLA, A.P.; MENDEZ, J.V.; QUINTERO, L.Z. Efecto del sistema de envasado y la concentración espermática sobre el daño acrosomal y la motilidad posdescongelación del semen equino. ***Vet. Méx. XXIII***, v.44, p.315-318, 1992.

ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; MANZANO, A. Inseminação artificial de equídeos com sêmen congelado em palhetas de 0,50 mL ***XX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária***, *Anais*, p.181, 1986.

ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; VIEIRA, R.C.; BARBOSA, R.T.; BARNABE, R.C.; VISINTIN, J.A. Inseminação artificial com sêmen de eqüinos acondicionado em palhetas de 0,50 mL. Utilização de um aplicador de sêmen para duas doses. ***X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal***, *Anais*, v.2, p. 260, 1993a.

ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; TAVEIRA, R.T.; VIEIRA, R.C.; VISINTIN, J.A. Duas técnicas para o congelamento do sêmen de eqüinos acondicionado em palhetas de 0,50 mL. ***X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal***, *Anais*, v.2, p. 327, 1993b.

ARRUDA, R.P.; VIEIRA, R.C.; VALENTE FILHO, J.B.; VISINTIN, J.A.; NEVES NETO, J.R. Utilização de uma seringa modificada para aplicação do sêmen equino congelado em bainhas plásticas e macrotubos. ***ARS Veterinaria***, Jaboticabal, v.10, n.2, p.242, 1994.

ARRUDA, R.P. ***Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).*** Tese de Livre Docência, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2000. 121 p.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVENCE, C.G.; GARCIA, A.R.; LIU, I.K.M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. ***Theriogenology***, v.58, p. 253-256, 2002.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. ***Acta Scientiae Veterinariae***, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 226-227, 2003a.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para espermatozóides de garanhões utilizando análises computadorizadas da motilidade (CASA) e citometria de fluxo. ***Acta Scientiae Veterinariae***, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 228-229, 2003b.

BAILEY, J.L.; BURH, M.M. Cryopreservation alters the Ca^{++} flux of bovine spermatozoa. ***Can. Journal of animal Science***, v. 74, p. 45-51, 1994.

BALL, B.A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitocondrial membrane potential. ***Journal of Andrology***, v. 22, n. 6, p. 1061-1069, 2001.

BARTHELEMY, D.; ROYERE, S.; HGAMMAHAH, C.; LEBOS, M.J.; THARANNE; LANSAC, J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. ***Archives of Andrology***, v. 25, n. 1, p.29-40, 1990.

BAVISTER, B.D.; LEIBFRIED, M.L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. ***Biology of Reproduction***, Wisconsin, v.28, n.1, p.235-247, 1983.

BAYYARI, G.R.; COOK, J.R.; HARRIS Jr, G.C.; MACY, L.B.; SLAVICK, M.F.; SKEELES, J.K. Research note: The evaluation of chicken spermatozoa using fluorescent staining in a 96-well format. ***Poultry Science***, v. 69, p. 1602-1605, 1990.

BEREITER-HAHN, J. Behavior of mitochondria in the living cell. ***International Review of Cytology***, v.122, p.1-103, 1990.

BILGILI, S.F.; RENDEN, J.A. Fluorimetric determination of avian sperm viability and concentration. ***Poultry Science***, v. 63, n. 11, p. 2275-77, 1984.

BLACH, E.L.; AMANN, R.P.; BOWEN, R.A.; FRANTZ, D. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation plasma membrane integrity and motion characteristics. ***Theriogenology***, v.31, n.2, p.283-298, 1989.

BLANES, M.S.; PAPA, F.O.; DORES, C.B.; MELO, C.M.; CROCCI, A.J. Influência do número de espermatozóides e tempo de estabilização na congelação de sêmen eqüino utilizando-se diluente Botu-Crio. ***Acta Scientiae Veterinariae***, Porto Alegre, Suplemento 1, v.33, p.303, 2005.

BRADBURY, D.A.; SIMMONS, T.D.; SLATER, K.J.; CROUCH, S.P.M. Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. ***Journal of Immunological Methods***, v. 240, p. 79-92, 2000.

BRANDON, C.I.; HEUSNER, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrulamide gel eltrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. ***Theriogenology***, v.52, p. 863-873, 1999..

BUHR, M.M.; CURTIS, E.F.; KAKUDA, N.S. Composition and behaviour of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. ***Cryobiology***, v.31, p.224-238, 1994.

CASEY, P.J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K.R.; YUDIN, A.I.; LIU, I.K.M.; DROBINS, E.Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. ***Journal of Andrology***, v. 14, n. 4, p. 289-297, 1993.

CELEGHINI, E.C.C. ***Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes.*** Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2005. 186 p.

COTTORELLO, A.C.P.; HENRY, M. Princípios da criopreservação, congelação e avaliação do sêmen eqüino (Revisão de Literatura). ***Revista Brasileira de Reprodução Animal***, Belo Horizonte, v.26, n. 1, p. 14-25, 2002.

CROCKETT, E.T.; GRAHAM, J.K.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Effect of cooling of equine spermatozoa before freezing on post-thaw motility; preliminary results. ***Theriogenology***, v.55, p.793-803, 2001.

CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET,J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome - reacted human sperm . ***Gamete Research***, v. 15, p. 213-226, 1986.

CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. ***Biology of Reproduction***, Wisconsin, v. 41, p. 635-641, 1989.

DELL`AQUA, J.A., Jr. ***Efeito da centrifugação, tipos de envase e temperatura de descongelação sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade realcionado com o local de deposiçaõ e concentração da dose inseminantedo sêmen congelado equino.*** Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001, 87p.

DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.; WOELDERS, H. The fix vital stain method: Simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. ***Journal of Andrology,*** v. 12, p. 112-118, 1991.

DE ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J. As mitocôndrias. In: ***Bases da biologia Celular e Molecular***. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 3.ed., p.155-175, 2001.

DIAZ-PERES, E.; THOMAS, P.; MEIZEL, S. Evidence suggesting a role for sperm methalloendoprotease activity in penetration of zone-free hamster eggs by human sperm. ***Journal of Experimental Zoological***, v. 248, p. 213-221, 1988.

DONNELLY, E.T.; Mc CLURE, M.D.; LEWIS, S.E.M. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. ***Fertility and Sterility***, v. 76, n. 5, 2001.

DORES, C.B.; PAPA, F.º; BLANES, M.S.; MELO, C.M.; DELL`AQUA Jr., J.A.; ALTERTI, K.; CROCCI, A.J. Influência de diferentes criopretetores e associações na congelabilidade de sêmen equino. ***Acta Scientiae Veterinariae***, Porto Alegre, Suplemento 1, v.33, p.302, 2005.

EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. *In*: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. cap. 2, p. 29-77. New York: Raven Press. 1994.

FAHY, G.M.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGLAS, M.S.J.; MERYMAN, H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction. In search of molecular mechanisms. ***Cryobiology***, v. 27, p. 247-268, 1990.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of *Psium sativum* agglutinin in identifying acrossomal damage in stallion spermatozoa. ***Molecular Reproduction and Development***, v. 32, p. 23-27, 1992.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. ***Biochim. Biophys. Acta***, v. 1469, p.197-235, 2000.

FREY,T.G.; MANNELLA, C.A. The internal structure of mitochondria. ***Trends in Biochemical Science***, v.25, n.7, p.319-324, 2000.

GADELLA, B.M.; MILLER, N.G.A.; COLENBRANDER, B.; van GOLDE, L.M.G.; HARRISON, R.A.P. Flow cytometric detection of transbilayer moviment of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labelling artifacts. ***Mol. Reproduction***, Derv.53, p. 108-125, 1999.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.H.M ; STOUT, T.A.E; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. ***Animal Reproduction Science***, v. 68, p. 249-265, 2001.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. ***Biology of Reproduction***, v. 34, p. 127-138, 1986.

GARNER, D.L.; THOMAS, A.C.; JOERG, H.W.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. ***Biology of Reproduction***, v. 57, p. 1401-06, 1997.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Reprodução Animal, Malone:Barueri, ed.7, cap.7, p. 97-110, 2004.

GARNER, D.L; THOMAS, A.C.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrossomal integrity of bovine spermatozoa. ***Reproduction in the Domestical Animal***, v.34, p.399-404, 1999.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytomitry. ***Biology of Reproduction***, Wisconsin, v. 43, p. 55-64, 1990.

GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. ***Veterinary Clinics of North America: Equine Practice***, v. 12, p. 131-147, 1996.

GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. ***Theriogenology***, v.53, p.1691-1703, 2000.

GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; MILLER, M.G.; BERGER, T. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. ***Reproductive Toxicology***, v. 15, p. 5-10, 2001.

GRIFFITHS, E.J. Mitochondria – potencial role in cell life and death. ***Cardiovascular Research***, v.46, p.24-27, 2000.

GRONDALL, C.; GRONDALL, M.L.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Acrosomal status in fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa evaluated by scanning electron microscopy. ***Anatomy and Embryology***, Berlim, v. 190, n.2, p.195-200, 1994.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Funções Reprodutoras e Hormonais Masculinas. In: Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.911-923, 1997.

HALANGK, W.; FRANK, K.; BOHNENSACK, R. Zur bestimmung der menge intakter spermien in bullenejakulaten. ***Archiev Exper Vet med, Leipzig***, v. 38, n. 1, p. 105-114, 1984.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. ***Journal of Andrology,*** v. 11, n.1, p. 73-88, 1990.

HAMMERSTED, R.H.; DRICHTON, E.G.; WATSON, P.F. Comparative approach to sperm cryopreservation: doses cell shape and size influence cryo-survival? ***Proceedings of Society of Theriogenology***, p.8-11, 1991.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. ***Journal of Reproduction and Fertility***, v. 88, p. 343-352, 1990.

HEITLAND, A.V.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K.; PICKETT, B.W.; HAMILTON, C. Factors affecting motion characteristics of frozen-thawed stallion spermatozoa. ***Equine Veterinary Journal***, v.28, p.47-53, 1996.

HEUVEL, L.V.; SMEITINK, J. The oxidative phophorilation (OXPHOS) system: nuclear genes and human genetics diseases. ***BioEssays***, Cambrigde, v.23, p.518-525, 2001.

HOLT, W.V.; NORTH, R.D. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. ***Journal of Experiment of Zoology***, v.230, p.473-483, 1984.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of especies and individual differences. ***Theriogenology***, v.53, p. 47-58, 2000.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *In*: CONGRESSO DE MEDICINA EQUINA, 1, Jaboticabal, SP, 1994. *Proceedings.* Jaboticabal, 1994, p. 156-165.

KEATES, R.A. Effects of glycerol on microtubule polymerization kinetics. ***Biochemistry and Biophysical Research Communication***, v. 97, p. 1163-1169, 1980.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares and preliminary findings. ***Proceedings of American Association Equine Practice***, p.327-335, 1975.

LEIPOLD, S.D.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L.; Mc CUE, P.M.; BRINSKO, S.P.; VANDERWALL, D.K. Effect of spermatozoal concentration and number on fertility of frozen equine semen. ***Theriogenology***, v.49, p. 1537-1543, 1998.

LINDSEY, A.C.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Low dose insemination of mares using non-sorted and sex-sorted sperm. ***Animal Reproduction Science***, v. 68, p.279-289, 2001.

LINDSEY, A.C.; VARNER, D.D.; SEIDEL, G.E.Jr; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Hysteroscopic or rectally guided deep-uterine insemination of mares with spermatozoa stored 18 h at either 5 degrees C or 15 degrees C prior to flow-cytometric sorting. ***Aminal Reproduction Science***, v. 85, p. 125-130, 2005.

LOOMIS, P.R.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Fertility of unfrozen stallion spermatozoa extended in EDTA-lactose-egg yolk and packed in straws. ***Journal of Animal Science***, Champaign, v.56, n.3, 1983.

LOOMIS, R.P.; CLARK, J.S. Motion characteristics of frozen-thawed equine spermatozoa packed in 0,5 mL straws at various concnetrations. ***Society for Theriogenology. Proceedings for annual Meeting***, Baltimore, 1998, p.142.

LOVE, C.C.; LOCH, W.L.; BRISTOL, F.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Comparison of pregnancy rates achieved with frozen semen using two packaging methods. ***Theriogenology***, v.31, n.3, p.613-622, 1989.

MANNING, S.T.; BOWMAN, P.A.; FRASER, L.M. CARD, C.E. Development of hysteroscopic insemination of the uterine tube in the mare. ***Proceedings of Annual Meeting Society for Theriogenology***, Baltimor, p. 84-85. 1998.

MARSHBURN, P.B.; Mc INTIRE, D.; CARR, B.R.; BYRD, W. Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. ***Fertility and Sterility***, v.58, p.179-186, 1992.

MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNTZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. ***Journal of Reproduction and Fertility***, suppl. 27, p. 47-51, 1979.

MARTINEZ-PASTOR, F.; JOHANNISSON, A.; GIL, J.; KAABI, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. ***Animal Reproduction Science***, v.84, p. 121-133, 2004.

MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; LUCIDI, P.; SEREN, E. Identification of capacitation in boar spermatozoa by chortetracicline staining. ***Theriogenology***, v. 45, p. 373-381, 1996.

MAXWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. ***Reproduction of Fertility and Development***, v. 8, p. 1165-1178, 1997.

MAZUR, P. Basic concepts in freezing cells. ***Porceedings of the First International Conference of Deep Freezing of Boar Semen***, Swedish University of Agricultural Science, Suíça, p.91-111

Mc DOWELL, K.J.; LITTLE, T.V.; TIMONEY, P.J.; ADMS, M.H. Characterization of proteins in the seminal plasma do stallions, geldings and geldings supplemented with testosterone. ***Research of Veterinary Science***, v. 61, p. 33-37, 1996.

MEDINA, M. Aplicação de sêmen sexado em animais de produção. ***Acta Scientiae Veterinariae***, v. 32, p.65-74, 2004. Suplemento.

MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS, J.; TESARIK, J. Distinction between true acrossome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. ***Journal of Reproduction and Fertility***, v. 95, p. 755-763, 1992.

MERKT, H.; KLUG, E.; KRAUSE, D.; BADER, H. Results of long term storage odf stallion semen frozen by the pellet method. ***Journal of Reproduction and Fertility***, Suppl. 23, p. 105-106, 1975.

MORTIMER, S.T.; SCHEVAERT, D.; SWAN, M.A.; MORTIMER, D. Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. ***Human Reproduction***, v. 12, p. 1006-1012, 1997.

NOTHLING, J.O.; SHUTTLEWORTH, R. The effect of straw size freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. ***Theriogenology***, v.63, p.1469-1480, 2005.

O'CONNELL, M.; Mc CLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. ***Human Reproduction***, v.17, n.3, p. 704-709, 2002.

OEHNINGER, S.; DURU, N.K.; SRISOMBUT, C.; MOSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome**.** ***Molecular and Celular Endocrinilogy***, v.169, p.3-10, 2000.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. ***International Review of Cytology***, v. 122, p. 105-151, 1990.

PAPA, F.O.; PRESTES, N.C.; ALVARENGA, M.A.; BICUDO, S.D.; BRANCO, M.D.L. Influência de diferentes volumes sobre os parâmetros espermáticos e sobre os índices de fertilidade de sêmen congelado de eqüino. ***Revista Brasileira de Reprodução Animal***, Belo Horizonte, suplemento, n.1, p.223, 1989.

PAPA, F.O.; TAVARES, C.V.N.; MEIRA, C.; BICUDO, S.O.; ALVARENGA, M.A. Glicina-gema: proposta de um novo diluidor para a congelação de sêmen eqüino. ***X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal***, *Anais*, v.2, p.326, 1993.

PAPA, F.O; DELL´AQUA, Jr, J.A. Efeito do tipo de envasamento e método de descongelação sobre parâmetros espermáticos e índices de fertilidade de sêmen congelado eqüino. ***Revista Brasileira de Reprodução Animal***, Belo Horizonte, v.25, n.3, 2001.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. ***Theriogenology***, Nova York, v.38, p.209-222, 1992.

PEGG, D.T.; DIAPER, M.D. The unfrozen fraction hypothesis of freezing injury to human erythrocytes: A critical examionation of the evidence. ***Cryobiology***, v. 36, n.30, 1989.

PEÑA, A.L.; QUINTELA, L.A.; HERRADÓN, P.G. Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. ***Theriogenology,*** v. 50, p. 1211-1220, 1998.

PETERSEN, M.M.WESSEL, M.T.; SCOTT, M.A.; LIU, I.K.M.; BALL, B.A. Embryo recovery rates in mares after deep intrauterine insemination with low numbers of cryopreserved equine spermatozoa. ***Theriogenology***, v.58, p.663-665, 2002.

PETERSON, R.N.; SILVERSTEIN, K.; FREUND, M. A rapid fluorometric method for the determination of DNA in human semen. ***Journal of Reproduction and Fertility***, v. 41, p. 485-488, 1974.

PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; BOWEN, R.A. et al. Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. ***Proceedings of American Equine Practice***, v.33, p.487, 1987.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. ***Biochemistry***, v.30, p.4480-4486, 1991.

ROBERTSON, L.; WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M. Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa sujected to cold shock. ***Cryo.-Letters***., v. 9, p. 286-293, 1988.

SAACKE, R.G. Semen quality in relation to semen preservation. ***Journal of Dairy Science***, v. 66, p. 2635-2644, 1983.

SAMPER, J.; MORRIS, C.A. Current methods for stallion sêmen cryopreservation: a survey. ***Theriogenology***, v. 49, p. 895-903, 1998.

SMILEY, S.T.; REERS, M.; MOTTOLA-HARTSHORN, C; LIN, M.; CHEN, A; SMITH, T.W.; STEELE, G.D.JR.; CHEN, L.B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. ***Cell Biology***, v. 88, p. 3671-3675, 1991.

SOUZA, N.L. ***Avaliação de técnicas para determinar a viabilidade e a integridade do acrossomo de espermatozóides criopreservados eqüinos.*** Pirassununga, 2001. 76p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SPUNGIN, B.; MARGALIT, I.; BREITBART, H. Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion**. *Journal of Cellular Science***, v. 108, p. 2525-2535, 1995.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Principles of Cryopreservation. In: *Cooled and frozen stallion semen*, Fort Collins, Colorado.Apostila. Fort Collins: College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences of Colorado State University, 1999a, p.43-47.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Factors affecting fertility of frozen-thawed spermatozoa. In: *Cooled and frozen stallion semen*, Fort Collins, Colorado.Apostila. Fort Collins: College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences of Colorado State University, 1999b, p.61-77.

SUH, T.K.; SCHENK, J.L.; SEIDEL, G.E.Jr. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. ***Theriogenology***, v. 64, p. 1035-1048, 2005.

TESARIK, J.; MENDOZA, C.; CARRERAS, A. Fast acrosome reaction measure: a highly sensitive method for evaluating stimulus-induced acrosome reaction. ***Fertility and Sterility***, v. 59, n. 2, p. 424-430, 1993.

THISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallion. ***Journal of Reproduction and Fertility***, Suppl. 27,p. 53-59, 1979.

THOMAS, C.A.; GANER, D.L.; DEJARNETE, J.M.; MARSHALL, C.E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determinated by flow cytometry. ***Biology of Reproduction***, v.58, n.3, p.786-793, 1998.

TROIANO, L.; GRANATA, A.R.; COSSARIZZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. ***Experimental Cellular Research***, v. 241, p. 384-393, 1998.

VALCÁRCEL, A.; DE LAS HERAS, M.A.; PÉREZ, L.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. ***Theriogenology***, v. 41, p. 483-89, 1994.

VAZQUEZ, J.J.; MEDINA, V.; LIU, I.K.; BALL, B.A. SCOTT, M.A. Nonsurgical utero-tubal insemination in the mare. ***Proceedings of Annual Meeting Society for Theriogenology***, Baltimor, p.82-83.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computed assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. ***Theriogenology***, v.57, p.140-179, 2002.

VIEIRA, R.C. Congelamento de sêmen eqüino em bainhas plásticas e macrotubos modificados. ***X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal***, *Anais*, v.2, p. 263, 1993.

VIEIRA, R.C.; DUARTE, M.B. Fertilidade de sêmen eqüino congelado em palhetas de 0,50 Ml e rediluído em E-Z Mixin. ***X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal***, *Anais*, v.2, p. 261, 1993.

VIERTH, G.L. Congelacion de semen equino; procesamiento en pellets y pajuellas. ***Archives of Veterinary Medicine***, v.11, p.123, 1979.

VISELISNOVIC, S.; PERKUCIN, R.; MILJKOVIC, V.; BESLIN, R.; SILASI, I.; PETRUJKIC, T.; MILOJEVIC, Z. The results of aplication the artificial fertilizing of mares by the use of deeply frozen semen taken from stallions in Vojvodina. ***Proceedings of 9th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination***, v.5, p.347, 1980.

VOLKMANN, D.H.; VAN-ZYL, D. Fertility of stallion semen frozen in 0,50 mL straws. ***Journal of Reproduction and Fertility***, Supl.., p.143-148, 1987.

WATSON, P.F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 483-492, 1981.

WATSON, P.F.; MORRIS, G.J. Cold shock injury in animal cells. ***Symposium of Society Experimental Biology***, v. 41, p. 311-340, 1987.

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

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

WOLFE, C.A.; JAMES, P.S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S.; JONES, R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1506-1514, 1998.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: Knobil, E.; Neill, J.D. The Physiology of Reproduction. *Raven Pess*, New York, p. 189-317, 1994.

8. ANEXOS

ANEXO 1

TALP *sperm* (BAVISTER et al., 1983)

1. SOLUÇÃO DE SAIS DO TALP (para preprar 500mL)

Componentes:

- NaCl ..... 2,1 g
- KCl ..... 0,935 g
- $NaHCO_3$ ……. 1,05 g
- NaH_2PO_4 ..... 0,025 g
- CaCl $2H_2O$ ..... 0,145 g
- MgCl $6H_2O$ .... 0,04 g
- Hepes ..... 3,25 g

Preparo:

- Diluir CaCl $2H_2O$ e MgCl $6H_2O$ em 200 mL de água destilada
- Diluir os outros sais em 200 mL de água destilada
- Combinar as duas soluções e completar para 500 mL
- Filtrar
- Manter resfriado

2. SOLUÇÃO DOS METABÓLITOS GLICOSADOS

Solução Estoque (para preparar 50 mL)

Componentes:

- Glicose ..... 2.5 g
- Lactato de Sódio ..... 9.25 mL
- Piruvato de Sódio ..... 70 mg
- Pen-Strep …… 12.5 ML

Preparo:

- Dissolver todos os componentes
- Aliquotar (alíquotas de 5 mL)
- Manter em freezer (-20° C)

Solução Trabalho

- Colocar 45 mL da Solução de Sais do TALP
- Ajustar o pH para 7,4
- Colocar 5 mL da Solução Estoque dos Metabólitos Glicosados
- Filtrar em filtro de 0,45 μm
- Aliquotar (alíquotas de 300 μL)
- Manter em freezer (-20° C)

3. PREPARO NO DIA

Componentes:

- 10 mL da Solução de Sais do TALP
- 200 μL da Solução (trabalho) de Metabólitos Glicosados
- 100 mg de soro albumina bovina (BSA)

Preparo:

- Dissolver o BSA em incubador por 10 minutos
- Ajustar o pH para 7,4
- Filtrar em filtro de 0,45 μm

ANEXO 2

DILUIÇÕES E PREPARO DAS SONDAS FLUORESCENTES

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

SOLUÇÃO ESTOQUE

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

SOLUÇÃO TRABALHO (0,5 mg/mL)

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

Armazenar em freezer, no escuro.

FITC-PSA (FITC-PSA, Sigma, L-0770 – 2 mg)

SOLUÇÃO TRABALHO (100 µg/mL)

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

Aliquotar e Armazenar a 4° C, no escuro

JC-1 (Molecular Probes, T-3168 – 5 mg)

SOLUÇÃO ESTOQUE (DMSO) - 1,53 mM

SOLUÇÃO TRABALHO (DMSO) - 153 µM

ANEXO 3

***SETUP* – HAMILTON THORNE BIOSCIENCES** (Ultimate – Sperm Analyzer)

CARACTERÍSTICA	AJUSTE
Número de imagens adquiridas	30
Taxa de aquisição das imagens	80 Hz
Contraste mínimo da célula	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células imóveis	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	60%
Referência de VAP para células lentas	20,0 µm/s
VAP mínimo para células progressivas	30,0 µm/s
Referência de VSL para células lentas	20,0 µm/s
Limite superior de tamanho da célula	1,51 pixels
Limite inferior de tamanho da célula	0,32 pixels
Limite superior de intensidade da célula	1,19
Limite inferior de intensidade da célula	0,24
Limite superior de alongamento da célula	98%
Limite inferior de alongamento da célula	0%
Tamanho da cabeça estática	0,32 a 1,51
Intensidade da cabeça estática	0,62 a 1,20
Aumento	1,89
Temperatura	37º C