

**Efeito da adição de glicerol em diferentes etapas do resfriamento na  
congelabilidade do sêmen equino**

*Effect of glycerol addition in different cooling periods on the freezability of equine  
semen*

Francisco José Gonçalves de *Oliveira*<sup>1</sup>; Rogério Oliveira *Pinho*<sup>2\*</sup>; Leonardo Franco  
*Martins*<sup>3</sup>; Morgana Cardoso Brasileiro *Borges*<sup>4</sup>; Giovanni Ribeiro de *Carvalho*<sup>2</sup>; José  
Domingos *Guimarães*<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Mestre em Reprodução Animal (DVT/UFV); <sup>2</sup>Departamento de Zootecnia (DZO/UFV); <sup>3</sup>Departamento  
de Veterinária da Faculdade Ananhuera Educacional de Dourados/MS; <sup>4</sup>Faculdade de Tecnologia e  
Ciência de Feira de Santana/BA; <sup>5</sup>Coordenador – Departamento de Veterinária (DVT/UFV); \* Autor  
correspondente (rogerio\_op@yahoo.com.br);

**Resumo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da adição do glicerol em diferentes etapas do resfriamento (pré-resfriamento e durante) do sêmen de garanhões, sobre os parâmetros de congelabilidade, como avaliações físicas e morfológicas do sêmen e testes complementares (teste hiposmótico, supravital e teste de termoresistência). Foram utilizados onze ejaculados de dois garanhões da raça Mangalarga Marchador. Não foram registradas diferenças ( $P > 0,05$ ) entre os valores médios obtidos nos protocolos utilizados. Esses registros sugerem que o tempo de contato entre o glicerol e o sêmen antes do processo de congelamento não interfere na qualidade e na longevidade do sêmen de garanhões após o descongelamento.

Palavras chave: Congelamento de sêmen, crioprotetor, garanhão, testes complementares.

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the effect of glycerol addition in different cooling periods (before and during) of stallion semen, over its freezability characteristics, such as physical and morphological evaluations and complementary tests (hyposmotic swelling test, supravital staining and termoresistance test). The study involved eleven ejaculates from two Mangalarga Marchador stallions. No relations ( $P > 0.05$ ) were registered among average values of the treatments. These results suggest that

the contact time between semen and glycerol does not affect quality and longevity of stallion semen after thawing.

Key words: complementary tests, cryoprotectant, semen freezing, stallion.

### **Introdução**

A descoberta do glicerol como agente crioprotetor revolucionou os métodos de criopreservação de células espermáticas. O glicerol é um álcool com três grupos hidroxila ligados a uma cadeia de 3 átomos de carbono (Keith, 1998). Quanto à sua forma de atuação, é classificado como agente crioprotetor permeável por atuar dentro do citoplasma celular (Holt, 2000), porém com possíveis atuações extracelulares (Berndston & Foote, 1969), sendo que o mecanismo de ação desse agente está relacionado principalmente à inibição da formação dos cristais de gelo no interior ou em locais adjacentes às células (Fabbrocini et al., 2000).

No entanto, o glicerol pode apresentar efeitos deletérios às células espermáticas, devido às suas características de peso molecular e osmolariadade. Os efeitos tóxicos relacionados a esse crioprotetor são o estresse osmótico, modificações da membrana plasmática espermática e a capacidade de ativar diversos mensageiros celulares (Hammersted & Graham, 1992).

O tempo de equilíbrio entre o crioprotetor e os espermatozoides é o intervalo necessário para que o crioprotetor penetre na célula espermática, caso seja sua função, desidratando-a e alterando o meio intracelular e extracelular, a fim de protegê-lo durante o processo de criopreservação (Muiño et al., 2007). Desta forma, o tempo de equilíbrio entre o glicerol e o sêmen, previamente ao congelamento, permite que o crioprotetor penetre a célula espermática e a desidrate, preparando-a para o congelamento. Esse intervalo melhora a qualidade espermática após o descongelamento na espécie equina (Fürst et al., 2003). No entanto, estudos envolvendo a avaliação da congelabilidade contestam essa hipótese ao demonstrarem que o tempo de equilíbrio não incrementa a qualidade espermática após o descongelamento (Snoeck et al., 2003).

Nesse sentido, a adição fracionada ou dissociada do glicerol durante o resfriamento do sêmen a ser congelado, pode contribuir para o advento da

criopreservação espermática, uma vez que mantendo as células com o menor tempo em contato possível com o glicerol, seu efeito tóxico não seria sentido pelas mesmas (Silva et al., 2006; Vidament et al., 2000). A solubilidade do glicerol faz com que a preservação das células espermáticas de garanhões seja eficiente, mesmo em intervalos curtos de exposição previamente ao congelamento (Guay & Rondeau, 1981).

Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição do crioprotetor glicerol com 0, 35 e 60 minutos de resfriamento do sêmen equino, sobre sua congelabilidade, observando parâmetros físicos de motilidade espermática total e retilínea, vigor espermático, morfologia espermática, avaliações de integridade física e funcional de membrana por testes hiposmóticos e supravitais e avaliações de longevidade por teste de termo resistência antes e após o congelamento.

### **Material e Métodos**

Foram selecionados dois garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idades entre 6 e 8 anos, em bom estado de condição corporal (escore 6 e 7, Henneke et al., 1983) criados em regime de semi-confinamento e com fertilidade comprovada no rebanho e por meio de avaliação morfológica do sêmen. O experimento foi realizado no Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, localizado no município de Viçosa/MG, Zona da Mata de Minas Gerais – Brasil (20° 46' 23" latitude sul e 42° 5' 10" longitude oeste).

As coletas de sêmen foram realizadas a cada dois dias com vagina artificial (modelo “Botucatu”), utilizando uma égua em estro como manequim para a estimulação e execução da monta pelos garanhões. Foram utilizados 6 ejaculados do animal 1 e 5 ejaculados do garanhão 2, totalizando 11 ejaculados utilizados para o congelamento de amostras.

O sêmen coletado foi diluído com meio de resfriamento a base de leite em pó (MaxSêmen Plus® – Agrofarma) para centrifugação a 600 x g por 10 minutos. Após a centrifugação o mesmo foi dividido em 3 alíquotas para a realização dos tratamentos.

O tratamento 1 (T1) consistiu na suspensão do pellet centrifugado com meio de congelamento descrito por Martin et al. (1979), contendo glicerol. Os tratamentos 2 e 3 (T2 e T3), consistiram na adição do mesmo meio, porém sem o glicerol na composição.

Todas as amostras foram submetidas ao resfriamento seguindo metodologia descrita por Fürst et al. (2003), sendo que nos demais tratamentos, o glicerol foi adicionado ao sêmen com 35 minutos de resfriamento (T2) e com 60 minutos de resfriamento (T3), e a diluição final totalizou 5 % de glicerol.

O sêmen “in natura” foi avaliado quanto à motilidade espermática progressiva total e retilínea, vigor espermático, percentual de células vivas por coloração supravital, teste hiposmótico e morfologia espermática.

A análise física do sêmen foi realizada em microscopia óptica, classificando motilidade progressiva retilínea e total (0 a 100%), e vigor espermático em escala de 1 a 5 (intercaladas a cada 0,5 ponto).

Solução de eosina (1 %) e negrosina (5 %) foi utilizada para corar o esfregaço do sêmen “in natura”, 30 segundos antes de contagem de células em microscopia óptica. As células vivas permaneciam sem corar-se e as mortas coravam-se em rosa avermelhados.

Para realização do teste hiposmótico os espermatozóides do sêmen “in natura” permaneceram incubados a 37° C por 30 minutos em solução de sacarose a 100 mOsm/kg, (Melo, 1999). A avaliação das células foi realizada em microscopia óptica com contraste de fase. Na análise, todas as células espermáticas apresentando dobra ou enrolamento do flagelo foram consideradas como células reativas ao teste (células vivas), e todas as células apresentando-se com o flagelo reto, foram consideradas não reativas (células mortas).

Para avaliação da morfologia espermática empregou-se o método de preparação úmida. Contabilizaram-se as patologias segundo a classificação de Blom (1973) e preconizadas pelo CBRA (1998), em defeitos maiores, defeitos menores e totais, analisando-os em microscopia óptica com contraste de fase em aumento de 1000X.

A concentração espermática foi realizada por meio de câmara de Neubauer espelhada (método hemocitométrico). Uma solução de sêmen foi feita com a adição de 10 µL do sêmen rediluído com o meio de congelamento e 1000 µL de solução de formol-salina tamponada. Em seguida a câmara de Neubauer foi preenchida com a solução de sêmen e avaliada em microscópio óptico em aumento de 400X. A concentração espermática foi corrigida para  $400 \times 10^6$  de espermatozóides por mL.

O congelamento do sêmen foi realizado em uma caixa isotérmica contendo nitrogênio líquido (-196° C). As palhetas já envasadas foram acondicionadas lado a lado, na posição horizontal, sobre uma plataforma. Essa estrutura proporcionou uma distância de 4 cm livres entre a lâmina do nitrogênio líquido e as palhetas. Após 20 minutos nessa posição, as mesmas foram submersas no nitrogênio líquido.

As palhetas foram descongeladas após o período mínimo de 16 dias, para análise de aspecto físico (motilidade espermática progressiva retilínea e total e vigor espermático) e testes complementares (morfológico, hiposmótico, coloração supravital e teste de termo resistência). O descongelamento das palhetas foi realizado em Banho-Maria a 75 °C por 7 segundos, de acordo com a metodologia descrita por Zúccari (1998).

As avaliações físicas, o teste de morfologia e o teste supravital do sêmen congelado/descongelado foram realizados conforme descrito para o sêmen “in natura”. Para a avaliação de teste hiposmótico do sêmen congelado/descongelado, adotou-se a mesma metodologia utilizada para o semen “in natura”.

O sêmen congelado/descongelado foi avaliado quanto à longevidade pelo teste de termo resistência. Amostras dos mesmos foram incubadas a 37 °C por até 120 minutos. Avaliações quanto aspecto físico do sêmen (motilidade espermática progressiva retilínea e vigor espermático) foram realizadas antes da incubação (tempo 0) e após 30, 60, 90 e 120 minutos, de acordo com a metodologia descrita por Zúccari (1998).

Foi utilizado o programa estatístico SAEG 9.1 (UFV – 2007). Para todas as variáveis foi realizada a estatística descritiva (média e desvio padrão).

Os dados quantitativos foram analisados por análise de variância (ANOVA) verificando o efeito de garanhões e diluentes, e quando houve significância, pelo teste “F”, compararam-se as médias pelo teste de Tukey, com 5 % de probabilidade de erro.

Para a característica de motilidade espermática total no teste de termo resistência foi realizada análise de regressão para verificar o comportamento da mesma em função do tempo de incubação, e para estimar a melhor equação para tal.

Foi efetuada análise de correlação simples de Pearson para verificar a relação entre os dados estudados, tanto para o sêmen “in natura”, quanto para o pré e pós-descongelados.

## Resultados e Discussão

Os parâmetros espermáticos, registrados para o sêmen “in natura”, estão descritos nas tabelas 1 e 2. Ambos os garanhões apresentaram motilidade espermática total próxima ao limiar mínimo exigido pelo CBRA (1998) (motilidade espermática total de 70%).

Tabela 1: Valores médios e desvios padrão de Motilidade espermática Total (MotTot), Motilidade espermática Progressiva Retilínea (MotRet) e vigor espermático de dois garanhões adultos da raça Mangalarga Marchador.

<i>Anim</i>	<i>MotTot (%)</i>	<i>MotRet (%)</i>	<i>Vigor</i>
1	67,5 ± 6,1	38,3 ± 2,6	2,9 ± 0,2
2	70,0 ± 5,0	46,01 ± 8,5	3,1 ± 0,2
Méd	68,6 ± 5,5	41,81 ± 7,2	3,0 ± 0,2
CV	8,2	15,0	7,1

Anim = animal; Méd = média; CV = coeficiente de variação.

P > 0,05 pelo ANOVA e teste de Tukey com 5 % de probabilidade de erro.

Os valores médios obtidos nos testes complementares e de morfologia espermática do sêmen “in natura” estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Valores médios e desvios padrão\* das análises morfológicas e de integridade de membrana espermática do sêmen “in natura” de dois garanhões da raça Mangalarga Marchador.

<i>Anim</i>	<i>Host (%)</i>	<i>SV (%)</i>	<i>DefMe (%)</i>	<i>DefMa (%)</i>	<i>DefTot (%)</i>
1	53,1 ± 8,4 <sup>A</sup>	70,5 ± 5,5 <sup>A</sup>	4,2 ± 2,7 <sup>A</sup>	25,21 ± 4,2 <sup>A</sup>	29,4 ± 4,6 <sup>A</sup>
2	52,9 ± 3,2 <sup>A</sup>	69,4 ± 7,5 <sup>A</sup>	6,81 ± 1,4 <sup>A</sup>	34,1 ± 4,3 <sup>B</sup>	40,91 ± 4,7 <sup>B</sup>
Méd	53,0 ± 6,3	70,01 ± 6,1	5,41 ± 2,6	29,3 ± 6,1	34,61 ± 7,4
CV	11,9	9,2	42,2	14,5	13,4

Anim = Animal; Host = teste hiposmótico; SV = coloração supravital por eosina-negrosina; DefMe = defeitos espermáticos menores; DefMa = defeitos espermáticos maiores; DefTot = defeitos espermáticos totais. Méd = média; CV = Coeficiente de Variação.

\*A e B ANOVA e teste de Tukey, p < 0,05.

A diferença registrada para os DefMa entre os garanhões se deve ao garanhão 1 se encontrar em regime de acasalamento, na ocasião do início do experimento, visto que o garanhão 2, mesmo tendo sido submetido à esgota das reservas gonádicas e extra-gonádicas por meio de coletas sucessivas de sêmen, ainda apresentou 11,3% de defeitos

de cauda, resultando em  $34,1 \pm 4,3\%$  de DefMa, o que não interferiu nos resultados de congelamento de sêmen, visto que não houve diferença entre os ganhões ( $P > 0,05$ ; tabelas 5, 8 e 9).

A qualidade espermática dos ejaculados dos animais foi avaliada em testes complementares. Optou-se por não acrescentar o teste de termo resistência, na avaliação do sêmen “in natura”, por se entender que não se tratava do objetivo deste estudo avaliar a longevidade do sêmen “in natura” e sim do sêmen congelado e descongelado. Nesse sentido, complementou-se a avaliação física das amostras de sêmen, por teste de integridade e funcionalidade de membrana plasmática (teste de Hiposmótico - HOST e Teste de coloração supravital por eosina-negrosina – SV, respectivamente). Adicionalmente, foram realizadas avaliações morfológicas do sêmen, por se tratar de um potencial parâmetro relacionado à fertilidade (Jasko, 1990).

Quanto às avaliações de integridade de membrana (hiposmótico e supravital), não foram registradas diferenças entre os animais. Da mesma forma, não foram registradas correlações ( $P > 0,05$ ) entre o teste hiposmóticos e colorações supravitais nas avaliações do sêmen “in natura” (tabela 3).

Tabela 3: Correlações simples de Pearson entre os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen “in natura” de dois ganhões da raça Mangalarga Marchador.

	<i>MotTot</i>	<i>MotRet</i>	<i>Vigor</i>	<i>Host</i>	<i>SV</i>	<i>DefMe</i>	<i>DefMa</i>	<i>DefTot</i>
<i>MotTot</i>	1	0,57	NS*	NS	NS	NS	NS	NS
<i>MotRet</i>		1	0,62	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Vigor</i>			1	NS	0,73	0,61	NS	NS
<i>Host</i>				1	NS	NS	NS	NS
<i>SV</i>					1	NS	NS	NS
<i>DefMe</i>						1	NS	0,64
<i>DefMa</i>							1	0,95
<i>DefTot</i>								1

MotTot = motilidade espermática total; MotRet = motilidade espermática progressiva retilínea; Host = teste hiposmótico; SV = coloração supravital por eosina-negrosina; DefMe = defeitos espermáticos menores; DefMa = defeitos espermáticos maiores; DefTot = defeitos espermáticos totais.

NS\* = não significativo.  $P > 0,05$ .

Os valores obtidos no teste hiposmótico não apresentaram correlação ( $P > 0,05$ ) com os valores obtidos no teste de coloração supravital. Por outro lado, ao avaliar os valores médios de motilidade espermática progressiva total, pode-se afirmar que a metodologia do teste hiposmótico propiciou alta incidência de espermatozóides reativos

na avaliação do sêmen eqüino “in natura”, devido à proximidade dos valores apresentados entre ambos os parâmetros (tabelas 1 e 2).

Não se verificou diferenças ( $P > 0,05$ ) quanto aos parâmetros físicos (motilidade progressiva total e vigor espermático) no sêmen pré-resfriado, diluído em meio contendo glicerol (tratamento 1 – controle) e em meios que não continham glicerol (tratamento 2 e tratamento 3) (tabela 4). Com os dados obtidos, verificou-se que a presença do glicerol e o possível choque osmótico provocado pelo mesmo (Hammersted & Graham, 1992) não foram evidenciados nesse estudo, ao se analisar a qualidade física do mesmo sêmen, imediatamente a adição dos diluidores.

Tabela 4: Valores médios e desvios padrão\* de motilidade espermática total (MotTot) e vigor espermático (vigor) do sêmen eqüino diluído pré-resfriamento, submetido a diferentes protocolos de diluição.

<i>Trat</i>	<i>MotTot (%)</i>	<i>Vigor</i>
1	69,1 ± 6,3	3,1 ± 0,3
2	67,3 ± 5,6	3,1 ± 0,2
3	65,9 ± 8,0	3,0 ± 0,4
Méd	67,4 ± 6,6	3,1 ± 0,3
<b>CV</b>	9,9	10,4

Tratamento 1 = controle com adição do glicerol antes do resfriamento. Tratamento 2 e 3 = adição do glicerol com 35 e 60 minutos de resfriamento, respectivamente.

$P > 0,05$  por ANOVA e teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

Os valores médios obtidos nas avaliações físicas, nos testes de integridade de membrana, realizados no sêmen, imediatamente após o descongelamento, estão descritos na tabela 5.



Tabela 5: Valores médios e desvios padrão\* de motilidade espermática total (MotTot), motilidade espermática progressiva retilínea (MotRet), vigor espermático (vigor), Teste Hiposmótico (Host) e supravital (SV) do sêmen equino congelado e descongelado, de acordo com os tratamentos (Trat).

<i>Trat</i>	<i>MotTot (%)</i>	<i>MotRet (%)</i>	<i>Vigor</i>	<i>Host (%)</i>	<i>SV (%)</i>
1	30,0 ± 6,7	25,9 ± 6,3	2,6 ± 0,5	29,3 ± 13,6	35,7 ± 7,4
2	30,0 ± 13,0	26,0 ± 11,9	2,5 ± 0,6	24,8 ± 9,4	37,1 ± 14,6
3	30,5 ± 11,1	26,2 ± 9,8	2,6 ± 0,6	19,0 ± 6,0	41,2 ± 12,0
Méd	30,2 ± 10,3	26,0 ± 9,3	2,6 ± 0,5	24,3 ± 6,0	38,0 ± 11,6
<b>CV</b>	35,2	36,9	21,4	24,6	30,9

Méd = média; CV = coeficiente de variação; Tratamento 1 = controle com adição do glicerol antes do resfriamento. Tratamento 2 e 3 = adição do glicerol com 35 e 60 minutos de resfriamento, respectivamente.

P > 0,05 por ANOVA e teste de Tukey com 5 % de probabilidade de erro.

Os valores de motilidade espermática total e retilínea mostram-se dentro dos padrões preconizados pelo CBRA (1998), para o sêmen congelado e descongelado, independente do tratamento analisado (motilidade total mínima = 30%). Isso sugere que o glicerol preservou, de maneira satisfatória, a motilidade espermática após o processo de criopreservação. No entanto, os valores de vigor permaneceram, em média (2,6 ± 0,5), ligeiramente inferiores ao recomendado pela referida entidade (vigor mínimo = 3).

Não foram observadas diferenças, para os parâmetros físicos, entre os valores médios de cada tratamento (P > 0,05). Esses resultados demonstram que o intervalo de exposição ao glicerol e o tempo de equilíbrio com o sêmen antes do congelamento, não interfere na qualidade seminal, quanto à motilidade espermática total, progressiva retilínea e vigor espermático. Adicionalmente, ao avaliar os resultados dos testes hiposmótico e supravital, percebe-se que a presença do glicerol interfere na integridade de membrana plasmática de maneira semelhante (P > 0,05), independente do tempo que o mesmo leva para atuar na célula (equilíbrio), sugerindo que a curva de resfriamento utilizada no processo de congelamento (Fürst et al., 2003) parece exercer maior influência no sucesso da criopreservação espermática, que o tempo de equilíbrio ou tempo de exposição do crioprotetor ao sêmen.

Tais observações corroboram os relatos de Nishkawa et al. (1975), que relataram que a ausência do tempo de equilíbrio com o glicerol não interfere na qualidade seminal do sêmen congelado e descongelado, ao comparar o procedimento com protocolos que utilizavam tempo de equilíbrio de 1 hora, antes do congelamento. Vidament et al.

(2000) relataram que a adição do glicerol no sêmen a 4°C, imediatamente antes do congelamento, não incrementa a qualidade espermática nas avaliações pós-descongelamento, sendo que essas conclusões são similares às do presente estudo, que verificou que o tempo de equilíbrio não apresentou efeito benéfico sobre a congelabilidade espermática. Adicionalmente, Guay & Rondeau (1981) relataram que a adição fracionada do glicerol, durante o processo de resfriamento do sêmen de garanhões, preserva, de maneira adequada, o sêmen, quando realizadas as avaliações pós-descongelamento.

No entanto, os estudos relacionados à adição de crioprotetores de células espermáticas, em diferentes etapas do resfriamento do sêmen, apresentam resultados contraditórios, quando analisados em outras espécies, ou mesmo com outros agentes crioprotetores. Mello et al. (2005) concluíram que a adição fracionada de dimetilformamida ao sêmen equino melhora os parâmetros de motilidade espermática progressiva e de integridade de membrana, não corroborando os resultados deste estudo.

Os registros de Silva et al. (2006) corroboram as conclusões do presente estudo. Os autores não observaram diferenças na congelabilidade do sêmen canino, quando compararam a adição do glicerol, durante diferentes etapas do resfriamento, antes do congelamento do mesmo. A adição do crioprotetor foi realizada quando o sêmen apresentava temperatura de 22° C ou de 4° C.

No presente estudo, a diferença entre o percentual de motilidade espermática total e motilidade espermática progressiva retilínea foi menor, após o congelamento do sêmen. Sugere-se com isso que as células espermáticas com motilidade curvilínea são mais sensíveis à criopreservação, e que o procedimento seleciona as células espermáticas com motilidade retilínea.

Na tabela 6, podem ser observados os valores de correlação simples de Pearson entre características físicas do sêmen equino pré-resfriamento, os testes Hiposmótico e supravital, independente dos protocolos de congelamento. Observa-se correlação positiva ( $P < 0,05$ ) entre os parâmetros físicos, dentro do sêmen congelado e descongelado e dentro do sêmen pré-resfriado, mas não entre os parâmetros físicos dos dois tipos de sêmen ( $P > 0,05$ ). Os valores obtidos nos testes hiposmóticos do sêmen congelado e descongelado não apresentaram correlações ( $P > 0,05$ ) com os parâmetros

físicos de ambos os tipos de sêmen, com exceção do vigor espermático do sêmen pré-resfriado, que apresentou valores de correlação considerados médios ( $r = 0,37$ ).

Tabela 6: Correlações simples de Pearson entre características físicas do sêmen equino diluído pré-resfriamento, com características físicas, teste Hiposmótico e supravital do sêmen pós descongelamento.

	<i>MotTotD</i>	<i>MotRetD</i>	<i>VigorD</i>	<i>MotPré</i>	<i>VigPré</i>	<i>HostD</i>	<i>SVD</i>
<i>Mot TotD</i>	1	0,96	0,80	NS*	NS	NS	0,81
<i>MotRetD</i>		1	0,79	NS	NS	NS	0,81
<i>VigorD</i>			1	NS	NS	NS	0,64
<i>Mot Pré</i>				1	0,37	NS	NS
<i>Vig Pré</i>					1	NS	NS
<i>HostD</i>						1	NS
<i>SVD</i>							1

*MotTotD* = motilidade total do sêmen congelado e descongelado; *MotRetD* = motilidade retilínea do sêmen congelado e descongelado; *VigorD* = vigor do sêmen congelado e descongelado; *MotPré* = motilidade total do sêmen pré-resfriamento; *VigorPré* = vigor do sêmen pré-resfriamento; *HostD* = teste hiposmótico do sêmen congelado e descongelado; *SVD* = coloração supravital por eosina-negrosina do sêmen congelado e descongelado.

NS\* = não significativo.  $P > 0,05$ .

Por outro lado, o teste supravital utilizado para o sêmen congelado e descongelado apresentou correlação alta ( $P < 0,05$ ) com os parâmetros físicos do sêmen congelado e descongelado.

Na tabela 7, podem ser observados os valores de correlação entre as características físicas pra o sêmen “in natura” e “congelado e descongelado” para os 3 diferentes protocolos de congelamento (T1, T2 e T3). Observou-se correlação entre os parâmetros físicos do sêmen, dentro dos três tratamentos propostos ( $P < 0,05$ ).

Tabela 7: Correlações simples de Pearson entre parâmetros espermáticos do sêmen “in natura” (IN) e congelado e descongelado (D) dos garanhões.

	<i>MotD</i>	<i>VigD</i>	<i>SVD</i>	<i>HostD</i>	<i>MotIN</i>	<i>VigIN</i>	<i>SVIN</i>	<i>HostIN</i>
<i>Tratamento 1</i>								
<i>MotD</i>	1	0,66	NS*	0,54	NS	NS	NS	NS
<i>VigD</i>		1	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>SVD</i>			1	NS	NS	NS	NS	NS
<i>HostD</i>				1	NS	NS	NS	NS
<i>Tratamento 2</i>								
<i>MotD</i>	1	0,94	NS	0,85	NS	NS	NS	NS
<i>VigD</i>		1	NS	0,78	NS	NS	NS	NS
<i>SVD</i>			1	NS	NS	0,54	0,52	NS
<i>HostD</i>				1	NS	NS	NS	NS
<i>Tratamento 3</i>								
<i>MotD</i>	1	0,69	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>VigD</i>		1	0,63	NS	NS	NS	NS	NS
<i>SVD</i>			1	NS	NS	NS	NS	NS
<i>HostD</i>				1	NS	NS	NS	NS

MotD = motilidade espermático total do sêmen congelado e descongelado; VigD = vigor espermático do sêmen congelado e descongelado; SVD = coloração supravital por eosina-negrosina do sêmen congelado e descongelado; HostD = teste hiposmótico do sêmen congelado e descongelado; MotIN = motilidade espermático total do sêmen “in natura” VigIN = vigor espermático do sêmen “in natura”; SVIN = coloração supravital por eosina-negrosina do sêmen “in natura”; HostIN = teste hiposmótico do sêmen “in natura”.

NS\* = não significativo.  $P > 0,05$ .

Correlações entre o teste hiposmótico, utilizado para o sêmen congelado e descongelado, e o parâmetro físico de motilidade espermática total do mesmo sêmen foram observadas em todos os tratamentos utilizados ( $P < 0,05$ ), com exceção do vigor espermático, analisado no tratamento 1 ( $P > 0,05$ ) (tabela 7). Estes dados estão de acordo com a literatura consultada, sendo que correlações entre os mesmos parâmetros do sêmen congelado foram descritas por Neild, et al. (1999) e Alves et al. (2005).

A coloração supravital do sêmen congelado e descongelado não apresentou correlação com os parâmetros físicos analisados ( $P > 0,05$ ), com exceção do vigor espermático das amostras descongeladas no tratamento 3. Com relação aos testes Hiposmóticos realizados nos protocolos de criopreservação (T1, T2 e T3), verificou-se correlação apenas entre os testes de integridade de membrana do sêmen “in natura” com a coloração supravital do sêmen congelado e descongelado, no tratamento 2 ( $P < 0,05$ ), não havendo correlação com as demais características estudadas no sêmen congelado e descongelado ( $P > 0,05$ ).

As diferenças de correlações entre os parâmetros do sêmen congelado e descongelado, podem ser observadas quando os valores das tabelas 6 e 7 são confrontados, sendo que tais diferenças se devem à avaliação por tratamento, onde o “n” amostral é reduzido. Isso modifica o grau de significância do coeficiente de correlação, mas não o valor do coeficiente em si. Por outro lado, a ausência de correlações entre muitos parâmetros analisados no presente estudo, mostra que os testes complementares utilizados possuem grande importância na avaliação espermática, uma vez que os mesmos possibilitam o conhecimento das alterações que ocorrem durante o procedimento de criopreservação, que não são evidenciados pelas avaliações convencionais de motilidade e vigor espermático.

Nesse sentido, Jasko (1990) propuseram que as análises da morfologia espermática poderiam substituir as triagens de fertilidade, devido ao fato de terem registrado correlação positiva entre o percentual de células espermáticas morfolologicamente normais e índices de gestação.

Porém, os dados da tabela 8 demonstram que, no presente estudo, não houve diferenças nos valores dos diferentes tratamentos, no que se refere a percentual de defeitos espermáticos maiores, defeitos espermáticos menores e defeitos espermáticos totais no sêmen congelado e descongelado, sugerindo que, possivelmente, não haja diferenças entre o sêmen submetido a cada tratamento, quanto à capacidade fecundante. Por outro lado, os valores de morfologia encontrados para o sêmen congelado e descongelado demonstram que o processo de criopreservação aumenta a quantidade de patologias espermáticas no sêmen equino (tabela 9).

Tabela 8: Valores médios e desvios padrão \* dos defeitos de patologia espermática do sêmen equino congelado e descongelado, de acordo com diferentes protocolos de congelamento.

<i>Trat</i>	<i>DefMa</i>	<i>DefMe</i>	<i>DefTot</i>
1	35,5 ± 12,0	4,6 ± 2,5	40,1 ± 11,5
2	33,7 ± 7,9	5,95 ± 2,8	39,6 ± 8,2
3	36,1 ± 8,9	8,2 ± 4,6	44,3 ± 7,7
Méd	35,1 ± 9,5	6,3 ± 3,6	41,4 ± 9,2
<b>CV</b>	27,8	54,7	22,4

DefMe = defeitos espermáticos menores; DefMa = defeitos espermáticos maiores; DefTot = defeitos espermáticos totais; Trat = tratamento; Méd = média; CV = Coeficiente de Variação.  
 (P < 0,05) ANOVA e teste de Tukey de 5 % de probabilidade erro.

As relações registradas entre o teste supravital e o percentual de defeitos espermáticos maiores, e defeitos espermáticos totais são consideradas médias ( $r = 0,49$ , e  $0,36$ , respectivamente,  $P < 0,05$ ). A correlação entre defeitos espermáticos menores e o mesmo teste é negativa ( $r = -0,37$ ,  $P < 0,05$ ), não sendo encontradas, no presente estudo, explicações biológicas para esse fato, uma vez que o teste supravital indicaria o percentual de células vivas (normais). Apesar disso, ressalta-se que Jasko (1990) relataram que os defeitos espermáticos possuem alta correlação com fertilidade. Os registros do presente estudo indicam que a coloração supravital foi o teste que mais se aproximou das avaliações morfológicas do sêmen, o que sugere relação desse teste com fertilidade, com base nos relatos desses autores.

Os valores de motilidade espermática total e vigor espermático de acordo com os tempos no teste de termoresistência estão descritos na tabela 9. Não foram registradas diferenças entre os valores médios dos diferentes tratamentos ( $P > 0,05$ ), havendo, para todos os tratamentos, comportamentos similares (comportamento quadrático em função do tempo).

Tabela 9: Valores médios e desvios padrão\* da motilidade espermática total (Mot) e do vigor espermático (vig) do sêmen equino congelado e descongelado, ao longo do tempo do teste de termoresistência.

<i>Teste de Termoresistência (minutos)</i>										
T	0		30		60		90		120	
	Mot	Vig	Mot	Vig	Mot	Vig	Mot	Vig	Mot	Vig
1	30,0 ±	2,6 ±	19,4±	2,0 ±	10,8±	1,7 ±	5,8 ±	1,3 ±	2,3 ±	0,8 ±
	6,7	0,5	9,4	0,3	5,5	0,4	3,7	0,4	3,0	0,5
2	30,0 ±	2,5 ±	15,9±	2,0 ±	10,5±	1,6 ±	7,4 ±	1,2 ±	4,4 ±	1,1 ±
	3,0	0,6	9,2	0,7	6,5	0,5	5,4	0,3	3,3	0,5
3	30,5 ±	2,6 ±	14,1±	2,1 ±	11,4±	1,6 ±	6,4 ±	1,3 ±	3,7 ±	1,1 ±
	11,1	0,6	7,7	0,2	7,4	0,4	4,9	0,4	2,8	0,2
x	30,2 ±	2,6 ±	16,5	2,0 ±	10,91	1,7 ±	6,5 ±	1,3 ±	3,5 ±	1,0 ±
	10,3	0,5	± 8,8	0,5	± 6,3	0,4	4,6	0,4	3,1	0,4

( $P > 0,05$ ) ANOVA e teste de Tukey com 5 % de probabilidade erro.

Os valores registrados no presente estudo sugerem que o tempo de equilíbrio com o glicerol não incrementa a longevidade das células espermáticas, não corroborando as conclusões de Ohata et al. (2005), que concluíram que o tempo de

equilíbrio com o glicerol é importante, por manter a integridade acrossomal da célula espermática e por aumentar sua longevidade.

É interessante notar que as médias de motilidade espermática e vigor espermáticos apresentaram resultados desfavoráveis quanto à fertilidade, a partir de 30 minutos, de acordo com os valores preconizados pelo CBRA (1998) (motilidade espermática total menor que 20%, e vigor espermático menor que 2). Esses resultados corroboram parcialmente os argumentos de Zúccari (1998), que concluiu que a avaliação de longevidade espermática de sêmen de garanhões deve ser reduzida em relação a outras espécies, uma vez que dificilmente apresentará mais de 10% de motilidade espermática e vigor espermático 2, com mais de 120 minutos de incubação, no teste de termo resistência. Para a autora, apesar da pouca motilidade espermática, o vigor espermático com escore 2 ainda apresenta relações com a fertilidade. No entanto, os dados na tabela 9 e a figura 1 demonstram que, com 90 minutos de incubação no teste de termoresistência, poucas foram as avaliações com mais de 10 % de população espermática viva, e nenhuma com escore maior que 2. Isso sugere que as amostras de sêmen congelado e descongelado obtidas nesse estudo não são aptas à fertilização, ao se avaliar a longevidade das mesmas, por meio do teste de termoresistência, proposto pela autora supracitada.

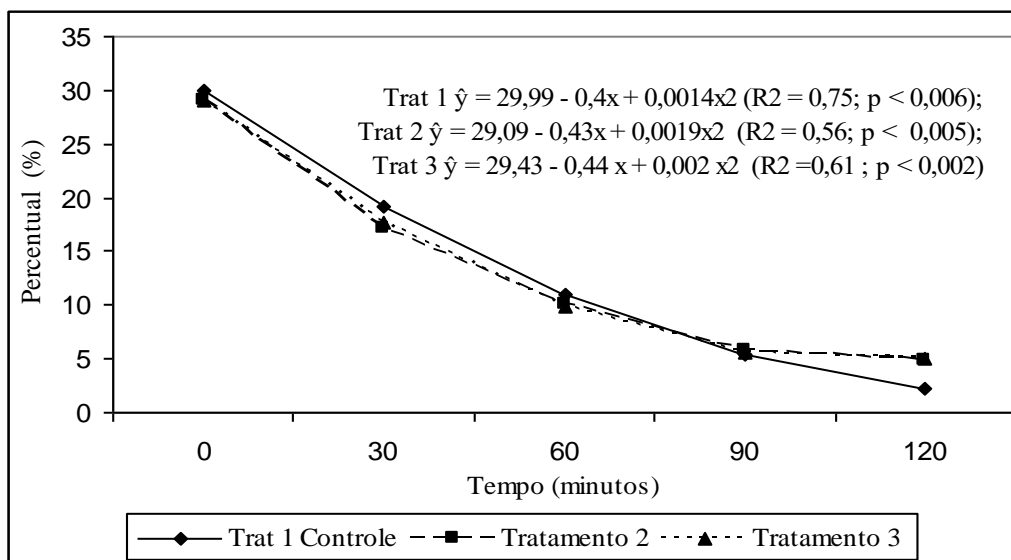


Figura 1: Motilidade espermática total de sêmen equino congelado e descongelado, em três diferentes protocolos de congelamento em função do tempo de teste de termoresistência.

### Conclusões

O tempo de equilíbrio do glicerol com o sêmen eqüino não contribui para melhoria na qualidade do processo de criopreservação. As amostras de sêmen, congeladas e descongeladas, submetidas ao teste de termorresistência, apresentaram resultados desfavoráveis quanto à fertilidade, com 30 minutos de incubação. As várias relações não significativas registradas entre os testes complementares e os parâmetros físicos do sêmen, demonstram que os parâmetros analisados são insubstituíveis entre si, de forma que analisam a qualidade espermática sob diferentes aspectos, contribuindo de forma complementar para a avaliação *in vitro* dos espermatozoides eqüinos como um todo.

### Literatura Citada

- Alves, S.G.G., Almeida, A.K., Bittencourt, A.P.M., et al. Teste hiposmótico em sêmen congelado eqüino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais...** (CD-ROM).
- Berndston, W.E., Foote, R.H. The survival of frozen bovine spermatozoa following minimum exposure to glycerol. **Cryobiology**, v.5, p.398-402, 1969.
- Blom, E. Pathological conditions in the genital organs and in semen as ground for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark. **Nord Veterinary Medicine**, v.35, p.105-130, 1973.
- Colégio Brasileiro De Reprodução Animal – CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**. 2ª ed. Belo Horizonte. 1998. 49p.
- Fabbrocini, A., Del Sorbo, C., Fasano, G., et al. Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of mediterranean buffalo (*B. bubalis*) spermatozoa. **Theriogenology** v. 57, p. 193-207, 2000.
- Fürst, R., Carvalho, G.R., Fürst, M.C.O., et al. Efeito do resfriamento na criopreservação do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 348-350, 2003.



- Guay, P., Rondeau, M. Effect of glycerol on motility, viability, extracellular aspirate aminotransferase release and fertility of stallion semen before and after freezing. **Equine Veterinary Journal**, v. 13, p. 177-182, 1981.
- Hammersted, R.H., Graham, J.K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-38, 1992.
- Holt, W.V. Basic aspects of frozen storage semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- Jasko, D.J. Determination of the relationship between sperm morphologic classification and fertility in stallions: 66 cases. **Journal American Veterinary Association**, v. 3, p. 389-394, 1990.
- Keith, S. L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa.**, Colorado: Colorado State University, 1998. 104p. Dissertação (Master of Science) – Colorado State University, 1998.
- Martin, J.C., Klug, E., Gunzel, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. **Journal Reproduction Fertility Supplement**, v. 27, p. 47-51, 1979.
- Mello, F.G., Silva, A., Gomes, M.G.T. et al. Efeitos da adição fracionada de dimetilformamida ao meio diluidor e de curvas de resfriamento na preservação da viabilidade de espermatozoides eqüinos congelados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais...** Goiás: Sociedade Brasileira de Reprodução Animal [2005] (CD-ROOM).
- Melo, M.I.V. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária/Universidade Federal de Minas Gerais, 1999. 104p. Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária/Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.
- Muiño, R., Fernández, M., Peña, A.I. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.305-311, 2007.
- Neild, D.M., Chaves, G., Flores, M., et al. Hyposmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, p. 721-727, 1999.

- Ohata, P.M., Bernardi, M.L., Bortolozzo, F.P., et al. Congelabilidade do sêmen suíno de acordo com o período de equilíbrio pré-congelamento e da sensibilidade ao resfriamento. **Archive Veterinary Science**, v. 10, p. 69-74, 2005.
- Silva, A.R., Cardoso, R.C.S., Silva, L.D.M. Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. **Reproducton in Domestic Animals**, v. 41, p. 74-78, 2006.
- Snoeck, P.P.N., Ferreira, M.K.V., Henry, M. Avaliação do efeito do transporte de sêmen eqüino no período pré-congelamento sobre a viabilidade espermática avaliada *in vitro* após o descongelamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 346-348, 2003.
- Universidade Federal De Viçosa – UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas 9.1**. Viçosa, MG, 2007.
- Vidament, M., Ecot, P., Noue, P., et al. Centrifugation and addition of glycerol at 22° C instead of 4° C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p. 907-919, 2000.
- Zúccari, C.E.S. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina**. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade Estadual Paulista, 1998. 121p. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Universidade Estadual Paulista, 1998.