

# Efeito de diferentes tempos de equilíbrio na criopreservação de sêmen de garanhões

## Effect of different equilibration times on cryopreservation of stallion semen

Guilherme Pugliesi,\* Rogério Fürst,\*\* Giovanni Ribeiro de Carvalho\*\*\*

### Resumo

Objetivou-se com este estudo avaliar a eficiência de diferentes tempos de equilíbrio sobre a viabilidade do sêmen congelado de garanhões. Foram utilizados 15 ejaculados de três garanhões da raça Mangalarga Marchador. O sêmen foi congelado após o resfriamento e permanência a 5°C nos seguintes tratamentos: T1 = tempo de equilíbrio de 25 minutos, T2 = tempo de equilíbrio 85 min, e T3 = tempo de equilíbrio com 145 min. A qualidade seminal foi avaliada através da motilidade progressiva, vigor, morfologia espermática, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, e teste de termo resistência. A motilidade progressiva e o vigor espermático avaliados pelo teste de termo resistência não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. A porcentagem de espermatozoides normais através da avaliação da morfologia espermática e a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e funcional avaliada respectivamente pelo teste hiposmótico e pelo supravital também não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Conclui-se que a utilização de tempos de equilíbrio longos (85 ou 145 minutos) previamente ao congelamento do sêmen de equinos não melhora a viabilidade deste, quando comparado ao tempo de equilíbrio de 25 minutos.

**Palavras-chave:** congelamento, diluidor seminal, equino, inseminação artificial.

### Abstract

The aim of this study was to evaluate efficiency of different equilibration times on viability of equine frozen semen. Were used 15 ejaculates from three stallions of Mangalarga Marchador breed. The semen samples were frozen after the cooling process and the semen holding at 5°C in the following treatments: T1 = equilibration time of 25 min; T2 = equilibration time of 85 min; and T3 = equilibration time of 145 min. The semen quality was evaluated for progressive motility, sperm vigor and morphologic characteristics, and by hyposmotic test, supravital test and during 90 minutes of a thermo resistant test. The progressive motility and sperm vigor evaluated during the thermo resistant test did not differ ( $p > 0.05$ ) among treatments. There was no difference among the treatments in semen quality by morphologic, hyposmotic and supravital tests ( $p > 0.05$ ). In conclusion, the use of longer equilibration times (85 or 145 minutes) before the semen cryopreservation does not improve the quality of thawed semen when compared with 25 minutes of equilibration time.

**Keywords:** artificial insemination, cryopreservation, equine, semen extender.

### Introdução

A criopreservação de sêmen representa uma importante ferramenta no melhoramento genético dos animais domésticos. Esta biotecnologia maximiza a exploração do potencial genético do reprodutor, permitindo maior número de descendentes de animais de alto mérito genético, redução nos custos do transporte e a melhoria no controle de doenças sexualmente transmissíveis (Vidament et al., 1997). Todavia, o processo de criopreservação pode causar danos à integridade estrutural, bioquímica e biofísica da membrana plasmática (MP) do espermatozoide, resultando em menor viabilidade e fertilidade do sêmen após o descongelamento (Klöppe et al., 1988).

A sobrevivência espermática ao resfriamento, congelamento e descongelamento depende das taxas de resfriamento e

aquecimento utilizadas, do tempo em que a célula permanece em cada etapa, e do transporte de substâncias pela MP. Contudo, a resposta celular mais importante durante o processo de congelamento é dada pela perda de água e pela formação de cristais de gelo intracelular (Amann, 1987). Neste contexto, o tempo de equilíbrio é considerado o tempo total em que os espermatozoides são mantidos em contato com todos os componentes do diluidor, previamente ao congelamento (Bittencourt et al., 2006). Durante esse período, ocorre o equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático e extracelular, formado por todos os componentes osmoticamente ativos presentes no diluente seminal (Salamon e Maxwell, 2000). O tempo de equilíbrio é extremamente importante para ação dos crioprotetores durante o processo de criopreservação do sêmen de garanhões (Squires et al., 2004; Alvarenga et al.,

\* Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n. Campus Universitário, CEP: 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. Autor para correspondência: pugliesi\_vet@hotmail.com.

\*\* Médico Veterinário autônomo, Bahia, Brasil.

\*\*\* Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Av. Peter Henry Rolfs, s/n. Campus Universitário, CEP: 36570-000, Viçosa, MG, Brasil.

2005). Além disso, um tempo de exposição prolongado com diluentes que apresentam glicerol em sua constituição podem promover toxicidade às células espermáticas e causar alterações osmóticas deletérias (Alvarenga et al., 2000). Segundo Oettlé (1986), um apropriado período de equilíbrio, assim como adequadas taxas de diluição e resfriamento celular, são fatores fundamentais para a prevenção de danos espermáticos durante o processo de criopreservação do sêmen.

Testes para avaliação da integridade e da funcionalidade da MP, assim como outras estruturas e organelas da célula espermática, é uma tendência para o futuro (Mocé e Graham, 2008), visto que avaliações da fertilidade *in vivo*, apesar de serem as mais adequadas, são mais onerosas e a cada dia tornam-se mais indisponíveis. Assim, apesar de não serem totalmente acurados, alguns testes de avaliação da integridade e funcionalidade da MP, como o teste hiposmótico (Host), o supravital e as sondas fluorescentes, têm sido comumente utilizados para se referir à viabilidade e estimar a fertilidade do sêmen equino (Graham e Mocé, 2005).

Apesar de importante, o efeito da manutenção da célula a 5°C (tempo de equilíbrio) sobre a viabilidade do sêmen descongelado de garanhões não é claramente conhecido. Objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito de três diferentes tempos de equilíbrio sobre a viabilidade *in vitro* do sêmen equino criopreservado.

## Material e métodos

O experimento foi realizado no Haras EAO da Fazenda Baviera, localizado no município de Itagibá-BA, situado a 14°17'11" latitude, 39°50'34" longitude, no período de outubro a março.

Foram utilizados quinze ejaculados de três garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idades de 5, 8 e 10 anos. Os animais foram considerados aptos à reprodução através de exame andrológico (CBRA, 1998) antes do início do período experimental. Todos os animais foram mantidos em baias individuais, recebendo dieta constituída de capim-cameron (*Pennisetum purpureum*) picado, sal mineral e água *ad libitum*, com suplementação de concentrado.

O esgotamento das reservas espermáticas extragonadais foi realizado utilizando-se duas colheitas seminais diárias por oito dias. Iniciando-se dois dias após a última colheita do esgotamento, foram colhidos de cada garanhão cinco ejaculados (dois ejaculados por semana), perfazendo o total de 15 ejaculados. As colheitas de sêmen foram realizadas empregando-se vagina artificial modelo "Hannover". Éguas em estro natural foram utilizadas como manequim para realização das colheitas.

O sêmen foi avaliado quanto às suas características físicas (volume, motilidade progressiva, vigor) e morfológicas. A avaliação da porcentagem de motilidade progressiva e o vigor (escala de 0 a 5) foi realizada através da deposição de uma alíquota de 10 µL de sêmen em lâminas de vidro previamente aquecidas, recobertas por lamínulas e avaliadas em microscópio óptico (200 vezes) por dois técnicos experientes. Para estas variáveis subjetivas foi considerada a média da avaliação dos dois técnicos. Para as demais características seminais, foi considerada a avaliação de apenas um técnico experiente. Para avaliação da morfologia espermática utilizou-se uma alíquota de 10 µL de sêmen e 1 mL de formol-salino, examinada

em microscopia óptica de contraste de fase com aumento de 1.000 vezes. Foram contadas 200 células para determinação do percentual de espermatozoides normais e anormais. As anormalidades espermáticas foram identificadas pela microscopia óptica com aumento de 1000x como previamente reportado por Varner (2008) e classificadas em defeitos maiores ou menores (CBRA, 1998).

Como testes complementares foram realizados o teste hiposmótico (Host) (Neild et al., 1999) e o teste supravital com eosina nigrosina (Oettlé, 1986) avaliando-se, respectivamente, a funcionalidade e a integridade e da MP dos espermatozoides.

A concentração espermática (número de Sptz/mL) do sêmen fresco e após a centrifugação foi avaliada com o auxílio de uma câmara Neubauer. O sêmen foi diluído na proporção de 10 µL de sêmen em 1 mL de solução de formol-salino tamponada antes de ser adicionado a câmara Neubauer.

Os diluentes de centrifugação a base de glicose-EDTA e de congelamento a base de gema de ovo (Martin et al., 1979) foram mantidos em banho-maria, a 37°C. Após a avaliação, o sêmen foi diluído (1:1) no diluente de centrifugação, e centrifugado a 650 x g, por 10 minutos. Após a centrifugação, resuspenderam-se os pellets com o diluente de congelamento. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL numa concentração total de 200 milhões de Sptz/mL no tempo máximo de 15 minutos após a centrifugação.

O resfriamento do sêmen foi realizado segundo Fürst et al. (2005). Ao final dos 35 minutos de resfriamento, tempo necessário para o sêmen chegar aos 5°C, as palhetas foram mantidas a esta temperatura e divididas nos seguintes tratamentos: Tratamento 1 (T1) - tempo de equilíbrio de 25 minutos; Tratamento 2 (T2) - tempo de equilíbrio de 85 minutos; e Tratamento 3 (T3) - tempo de equilíbrio de 145 minutos. Os tempos de equilíbrios propostos foram baseados no período curto (25 minutos) já amplamente utilizado em equinos (Fürst et al., 2005; Papa et al., 2011) e os períodos longos (1-3 horas) utilizados em outras espécies (Dhami et al., 1993; Bittencourt et al., 2006; Leite et al., 2010).

O congelamento foi realizado em vapor de nitrogênio líquido por quinze minutos, colocando-se as palhetas sobre um suporte de aço inoxidável a 4 cm acima do nitrogênio líquido, acondicionado em uma caixa de isopor com 40 cm de comprimento x 32 cm de altura x 20 cm de largura. Após esse período, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio, para congelamento final do sêmen e armazenadas em botijão com nitrogênio.

O sêmen foi descongelado em banho-maria a 37°C e acondicionado em um tubo plástico cônico de 1,5 mL. A longevidade dos espermatozoides descongelados foi avaliada por meio do teste de termorresistência -TTR (sêmen incubado em banho-maria a 37°C, por 90 minutos). As avaliações de motilidade progressiva e vigor espermático foram realizadas nos tempos 0, 20, 40, 60 e 90 minutos. Ainda no tempo 0, foram retiradas alíquotas de 10 µL de sêmen, para avaliação da morfologia espermática e dos testes complementares de Host e supravital como descritos previamente.

Para realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa SAEG. Os dados que não seguiram distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk foram transformados para log ou rank e avaliados pela análise de variância e a média comparada pelo teste Student-Newman Keuls, a 5% de significância.

## Resultados e discussão

As características físico-morfológicas e funcional do sêmen fresco (Tabela 1) situaram-se dentro dos valores-padrões normais considerados para a espécie equina (Jasko, 1992; CBRA, 1998). Na avaliação da funcionalidade e integridade da MP, a porcentagem média de espermatozoides reativos ao Host e íntegros pelo teste supravital foi, respectivamente, de 40,7% e 80,2%. Os resultados obtidos no Host e teste supravital aproximam-se de valores médios descritos para a espécie equina (Neild et al., 1999; Melo e Henry, 1999; Nunes et al., 2008).

**Tabela 1:** Média  $\pm$  DP das características físico-morfológicas e funcionais do sêmen fresco de três garanhões da raça Mangalarga Marchador

Características físicas	Garanhões		
	1	2	3
Volume (mL)	37 $\pm$ 19,2 <sup>AB</sup>	21 $\pm$ 5,5 <sup>B</sup>	52 $\pm$ 8,4 <sup>A</sup>
Concentração (Sptz x10 <sup>6</sup> )	28,8 $\pm$ 19,8 <sup>B</sup>	60,6 $\pm$ 3,7 <sup>A</sup>	34 $\pm$ 14,8 <sup>B</sup>
Motilidade progressiva (%)	67 $\pm$ 6,7	65 $\pm$ 8,7	71 $\pm$ 7,4
Vigor (0-5)	4,2 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 0,3
Características morfológicas			
Defeitos maiores	7,6 $\pm$ 2,5	14,6 $\pm$ 5,4	9,5 $\pm$ 3,0
Defeitos menores	3,5 $\pm$ 1,5	3,6 $\pm$ 0,5	3,0 $\pm$ 2,0
Características funcionais			
% de Sptz reativos ao Host	39,6 $\pm$ 5,9 <sup>B</sup>	29,6 $\pm$ 12,3 <sup>B</sup>	52,8 $\pm$ 11,2 <sup>A</sup>
% de Sptz com MP íntegra pelo teste supravital	87,2 $\pm$ 4,8 <sup>A</sup>	65,8 $\pm$ 12,1 <sup>B</sup>	89,6 $\pm$ 3,4 <sup>A</sup>

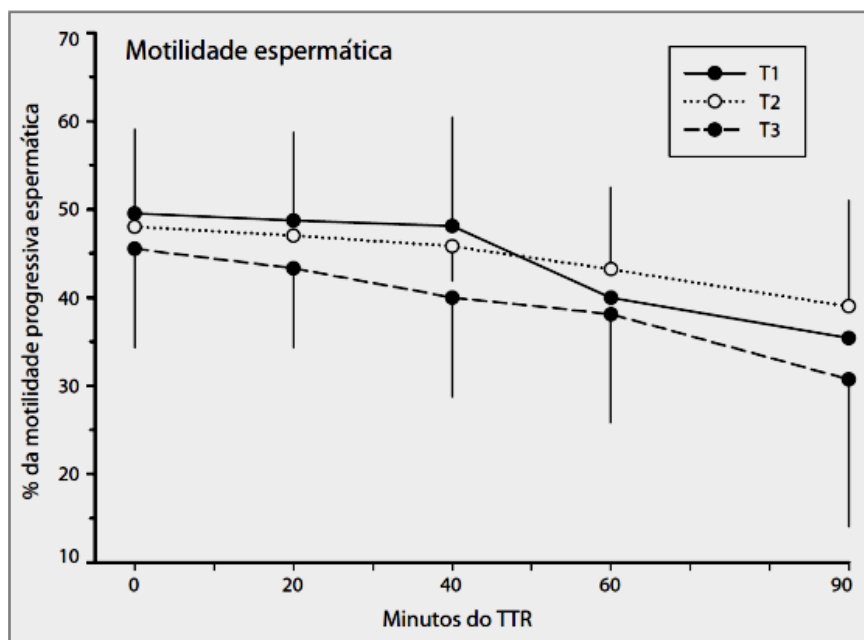
Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman Keuls.

Apesar dos resultados das características seminais indicarem que as amostras do sêmen fresco dos três garanhões estavam aptas a serem submetidas ao processo de congelamento, o Garanhão 3 apresentou maior ( $p < 0,05$ ) porcentagem de espermatozoides com a MP funcional em relação ao Garanhão 1 e 2 e maior ( $p < 0,05$ ) porcentagem de espermatozoides com MP íntegra pelo teste supravital do que o Garanhão 2. Apesar do sêmen do Garanhão 3 possuir uma integridade e funcionalidade de MP superior, isto não refletiu em melhora na qualidade seminal deste garanhão pós-descongelamento (dados não apresentados). A similaridade entre a qualidade seminal dos três garanhões após o descongelamento mesmo com a superioridade do sêmen do Garanhão 3 a fresco, pode advir da multifatorial natureza da função espermática, não se restringindo apenas à integridade e funcionalidade da MP (Mocé e Graham, 2008). Além disso, foi reportado em equinos (Brisko et al., 2000) a ocorrência do efeito individual entre garanhões sobre a susceptibilidade

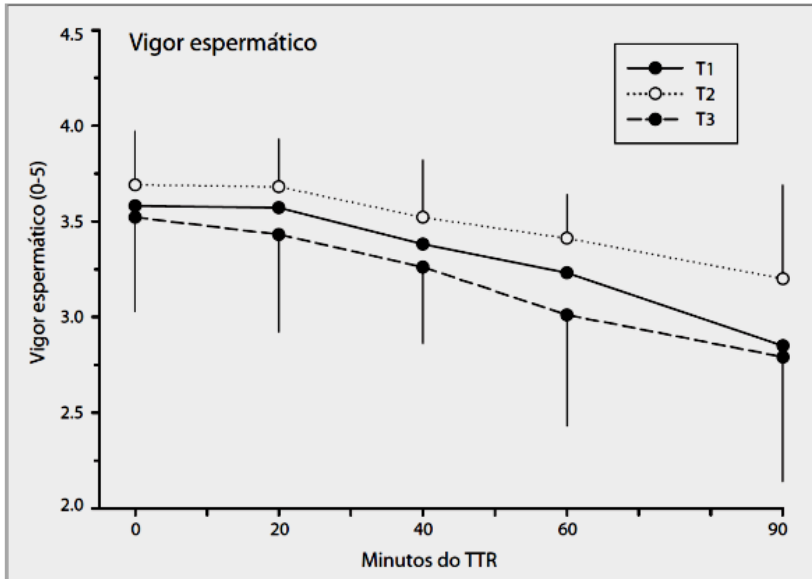
a lesões durante o processo de criopreservação. Desta forma, o sêmen fresco de qualidade seminal superior é importante, mas não garante um melhor resultado de viabilidade do sêmen após o descongelamento.

Não houve diferenças ( $p > 0,05$ ) entre os resultados do sêmen congelado, quanto à motilidade progressiva (Figura 1) e vigor espermático (Figura 2) durante o TTR, nos tempos de 0, 20, 40, 60 e 90 minutos. Isto indica que a manutenção do sêmen equino em contato com o diluente de congelamento por 25, 85 ou 145 minutos após o resfriamento a 5°C não interferiu na capacidade de movimentação e velocidade de progressão da célula espermática após os 90 minutos do TTR. Apesar do

tempo de equilíbrio mais adequado variar entre as espécies de animais domésticos, entre o tipo de diluentes e a curva de resfriamento utilizados, em bovinos, o resfriamento lento do sêmen seguido por um tempo de equilíbrio de 2 horas a 5°C melhora a motilidade espermática e a fertilidade do sêmen descongelado, em comparação ao sêmen que não é submetido ao tempo de equilíbrio (Dhami et al., 1992; Dhami e Sahni, 1993; Leite et al., 2010). Por outro lado, o período prolongado de permanência do sêmen com o diluente de congelamento pode promover efeito adverso na viabilidade seminal (Ennen et al., 1976), refletindo, assim, a necessidade de se estimar o melhor tempo de equilíbrio para cada espécie, considerando-se o tipo de diluente e a curva de resfriamento a serem utilizados.



**Figura 1:** Porcentagem média  $\pm$  DP da motilidade progressiva espermática, durante os 90 minutos do teste de termo resistência (TTR), do sêmen descongelado ( $n=15$  ejaculados) de três garanhões, submetido ao tempo de equilíbrio de 25 (T1), 85 (T2) e 145 minutos (T3) previamente ao congelamento. Os valores médios obtidos não diferem entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).



**Figura 2:** Média  $\pm$  DP do vigor espermático, durante os 90 minutos do teste de termo resistência (TTR), do sêmen descongelado ( $n=15$  ejaculados) de três garanhões, submetido ao tempo de equilíbrio de 25 (T1), 85 (T2) e 145 minutos (T3) previamente ao congelamento. Os valores médios obtidos não diferem entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Os valores obtidos para motilidade progressiva do sêmen descongelado encontrados no presente estudo estão acima dos valores reportados na espécie equina (Cochran et al., 1984; Vidament et al., 1997; Papa et al., 2001), comprovando a eficácia do protocolo de congelamento utilizado. Considerando-se os três tratamentos agrupados, houve queda de 18,4 % da motilidade progressiva do sêmen descongelado ao tempo 0 do TTR em comparação ao sêmen fresco (67,7% vs. 49,3%). Este decréscimo reflete os danos causados pelo processo de criopreservação nas estruturas e organelas espermáticas envolvidas na movimentação espermática (Watson, 1995).

Ao final do TTR (90 minutos), 34% dos espermatozoides apresentavam motilidade progressiva. Estes valores situaram-se dentro dos valores padrões reportados para a espécie equina (Vidament et al., 2000; CBRA, 1998), indicando que o sêmen descongelado nos três tratamentos suportou o estresse térmico promovido durante o TTR e estava apto para ser utilizado na técnica de inseminação artificial.

Os resultados obtidos de morfologia espermática do sêmen fresco e descongelado estão resumidos na Tabela 2. Dentre as patologias espermáticas, o acrossoma é uma das estruturas mais importantes e susceptíveis aos danos e alterações provocados durante o processo de congelamento (Garner et al., 1999). No presente estudo não foi observado aumento de patologias de acrossoma após o descongelamento pela microscopia de contraste de fase. Estes valores diferem dos observados por Brisko et al., (2000), que registraram aumento das patologias de acrossoma após o descongelamento. Os resultados indicaram que a técnica de congelamento utilizada neste estudo,

independentemente do tempo de equilíbrio, não afetou o percentual de patologia espermática.

A MP tem função de permitir o transporte seletivo de moléculas através da célula e sua integridade é importante para que ocorram as reações necessárias à união dos gametas masculino e feminino (Jeyendran et al., 1984). Na avaliação do efeito do tempo de equilíbrio sobre a integridade e funcionalidade da MP de espermatozoides congelados, não foi verificada diferença ( $p > 0,05$ ) entre os três tempos de equilíbrio utilizados, através do Host (funcionalidade) e do teste supravital (integridade), como sumariado na Figura 3. Esta similaridade entre os tratamentos sugeriu que não houve alteração no processo de proteção da MP em função do tempo de equilíbrio, ao contrário do sugerido por Watson (2000). Diferentemente do presente estudo, em bovinos, Leite et al. (2010) reportaram que a utilização de tempo de equilíbrio de 2 ou 4 horas aumentou a porcentagem de espermatozoides com a MP e membrana acrossomal íntegra utilizando-se dois diluentes seminais (TRIS e BIO). Isto reflete na espécie supracitada a necessidade de tempos de equilíbrios mais longos com estes diluentes para promover estabilização das membranas espermáticas e ação dos crioprotetores. Como

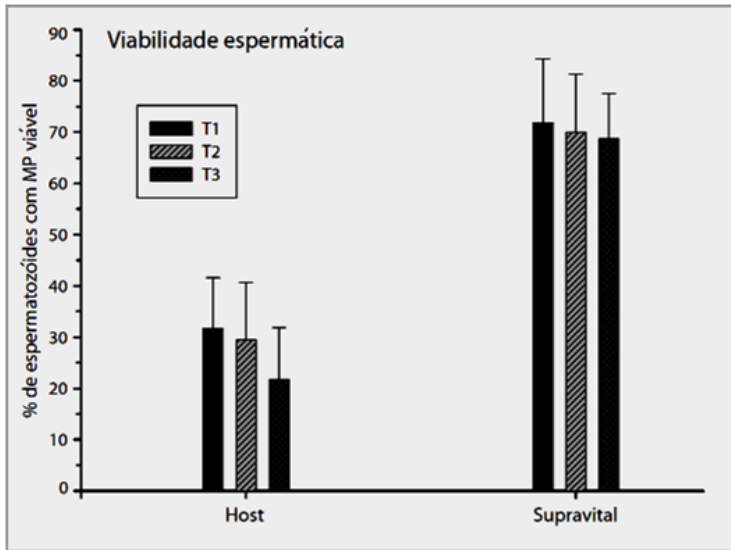
não houve diferença entre os tratamentos no presente estudo, o valor médio de espermatozoides com a MP funcional pelo Host e íntegra pelo teste supravital foram agrupados e se constituíram, respectivamente, por: 27,3% e 68,8 % de espermatozoides viáveis. Estes valores refletiram a inferioridade da qualidade da MP do sêmen após o descongelamento em relação ao sêmen fresco e indicaram que o processo de congelamento do sêmen, independentemente do tempo de equilíbrio, promoveu danos à integridade e funcionalidade da MP do sêmen equino.

**Tabela 2:** Porcentagem média  $\pm$  DP das principais patologias espermáticas apresentadas no sêmen equino fresco e congelado ( $n=15$  ejaculados), previamente submetido ao tempo de equilíbrio de 25 (T1), 85 (T2) e 145 minutos (T3)

	Sêmen fresco	Tratamento		
		T1	T2	T3
Acrossoma	4,6 $\pm$ 3,4	7,2 $\pm$ 3,4	8,1 $\pm$ 3,7	9,5 $\pm$ 7
Gota citoplasmática proximal	1,1 $\pm$ 2,1	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Cauda fortemente dobrada	4,9 $\pm$ 4,0	2,9 $\pm$ 2,5	3,3 $\pm$ 3	3,3 $\pm$ 2,8
Patologia de peça intermediária	2,1 $\pm$ 2,8	1,5 $\pm$ 1,8	0,7 $\pm$ 1,7	0,6 $\pm$ 1,3
Patologia de cabeça	1,7 $\pm$ 1,8	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Médias na mesma linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ) pelo teste de Student-Newman Keuls.

Considerando a viabilidade seminal *in vitro* do sêmen descongelado, a similaridade entre os três tempos de equilíbrio no presente estudo indicou que o tempo de 25 minutos é suficiente para se obter o equilíbrio osmótico entre o meio intracelular espermático e extracelular, impedindo, assim, a formação de cristais de gelo que possam danificar a viabilidade



**Figura 3:** Porcentagem média  $\pm$  DP de espermatozoides com a membrana plasmática (MP) reativa ao Host e íntegra pelo teste supravital no sêmen descongelado ( $n=15$  ejaculados) de três garanhões, submetido ao tempo de equilíbrio de 25 (T1), 85 (T2) ou 145 minutos (T3) previamente ao congelamento. Os valores médios obtidos não diferem entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ).

## Referências

- ALVARENGA, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MOREIRA, R.M.; ESARINO, M.M. Acrossomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Veterinary Journal*, v. 32, p. 541-545, 2000.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Animal Reproduction Science*, v. 89, p. 105-113, 2005.
- AMANN, R.P. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, v. 7, p. 145-173, 1987.
- BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; ALVES, S.G.G.; BISCARDE, C.E.; VASCONCELOS, M.F.; OBA, E. O efeito do tempo de equilíbrio sobre a qualidade do sêmen caprino criopreservado. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 7, p. 27-37, 2006.
- BRISKO, S.P.; VAN WAGNER, G.S.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, L.E. Motility, morphology and triple stain analysis of fresh, cooled and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 56, p. 111-120, 2000.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2. ed. Belo Horizonte: 1998. p. 25-27.
- CHENOWETH, P. J. Genetic sperm defects. *Theriogenology*, v.64, p. 457-468, 2005.
- COCHRAN, J.D.; AMANN, R.P.; FROMAN, D.P.; PICKETT, B.W. Effects of centrifugation, glycerol level cooling to 5°C, freezing rate and thawing rate on the post-thaw motility of equine sperm. *Theriogenology*, v. 2, p. 25-28, 1984.
- DHAMI, A.J.; SAHNI, K.L. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. *Theriogenology*, v. 40, p. 1269-1280, 1993.
- DHAMI, A.J.; SAHNI, K.L.; MOHAN, G. Effect of various cooling rates (from 30°C to 5°C) and thawing temperatures on the deep-freezing of *Bos taurus* and *Bos bubalis* semen. *Theriogenology*, v. 38, p. 565-574, 1992.

da célula espermática (Salamon e Maxwell, 2000). Desta maneira, a utilização do tempo de equilíbrio de 25 minutos com o presente protocolo para o congelamento do sêmen de garanhões, pode possibilitar maior rapidez e praticidade no processo de congelamento do sêmen equino. Além disso, um tempo de exposição prolongado com diluentes que apresentam glicerol na sua constituição pode promover toxicidade às células espermáticas e causar alterações osmóticas que prejudiquem a viabilidade espermática após o descongelamento (Alvarenga et al., 2000). Ressalta-se que tais testes complementares utilizados neste estudo refletem a viabilidade espermática, sendo apenas indicadores da fertilidade do sêmen (Mocé e Graham, 2008), e que a avaliação da fertilidade do sêmen através da taxa de gestação após a inseminação artificial deve ser considerada em estudos futuros.

## Conclusões

Uso de tempos de equilíbrio longos (85 ou 145 minutos) não altera a viabilidade do sêmen equino após o processo de criopreservação em relação ao tempo de equilíbrio de 25 minutos.

- ENNEN, B.D.; BERNDTSON, W.E.; MORTIMER, R.G.; PICKETT, B.W. Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa frozen in 25-ml straws. *Journal of Animal Science*, v. 43, 1976.
- FÜRST, R.; CARVALHO, G.R.; FÜRST, M.C.O.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M.; MAFILLI, V. Efeito do resfriamento do sêmen equino sobre sua congelabilidade. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, p. 599-607, 2005.
- GARNER, D.L.; THOMAS, C.A.; GRAVANCE, C.G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrossomal integrity of bovine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 34, p. 399-404, 1999.
- GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*, v. 64, p. 492-504, 2005.
- JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; MORAN, D.M., FARLIN, M.E. Comparison of pregnancy rates utilizing fresh, cooled and frozen semen. *Proceedings...* In: XII International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination., 1992, Hague. Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, 1992. p. 1439-1441.
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 70, p. 219-228, 1984.
- KLÖPPE, L.H.; VARNER, D.D.; ELMORE, R.G.; BRERZLAFF, K.N.; SHULL, J.W.. Effect of insemination timing on the fertilizing capacity of frozen/thawed equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 29, p. 429-439, 1988.
- LEITE, T.G.; VALE FILHO, V.R.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; EMERICK, L.L.; ZAFFALON, F.G.; MARTINS, J.A.M.; ANDRADE, V.J. Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, v. 20, p. 31-38, 2010.
- MARTIN, J.C.; KLUG, E.; GUNZEL, A.R. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 27, p. 47-51, 1979.

- MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p. 71-78, 1999.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K. In vitro evaluation of sperm quality. *Animal Reproduction Science*, v. 105, p.104-108, 2008.
- NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUERO. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 51, p. 721-727, 1999.
- NUNES, D.B.; ZORZATTO, J.R.; COSTA e SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. *Animal Reproduction Science*, v.104, p. 434-439, 2008.
- OETTLÉ, E.E. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen. *Animal Reproduction Science*, v. 12, p. 145-150, 1986.
- PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JR., J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen eqüino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, p. 184-187, 2001.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v. 62, p. 77-111, 2000.
- SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 62, p. 1056-1065, 2004.
- VARNER, D.D. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*, v. 70, p. 448-462, 2008.
- VIDAMENT, M., DUPERE, A.M., JULIENNE, P., EVAIN, A., NOUE, P., PALMER, E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, v. 48, p. 907-917, 1997.
- VIDAMENT, M.; ECOT, P.; NOUE, P.; BOURGEOIS, C.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v. 54, p. 907-919, 2000.
- PAPA, F. O.; FELÍCIO, G. B.; MELO-OÑAA, C. M.; ALVARENGA, M. A.; de VITA, B.; TRINQUE, C.; PUOLI-FILHO J. N. P.; DELL'AQUA JR, J. A. Replacing egg yolk with soybean lecithin in the cryopreservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science*, v. 129, p. 73-77, 2011.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-61, p. 481-492, 2000.