



## Influência de diferentes sistemas e curvas de congelamento na congelabilidade e fertilidade do sêmen equino

[Influence of systems and freezing curve in equine semen freezability and fertility]

B. Vita<sup>1</sup>, G.A. Monteiro<sup>2\*</sup>, C.M. Melo<sup>1</sup>, R.R. Maziero<sup>1</sup>, M.T. Carmo<sup>1</sup>,  
M.A. Alvarenga<sup>1</sup>, P.A. Dutra<sup>2</sup>, Y.F.R. Sancler-Silva<sup>3</sup>, F.O. Papa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista - Botucatu, SP

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

<sup>3</sup>Universidade Federal de Viçosa - Viçosa, MG

B. Vita  
<https://orcid.org/0000-0001-6874-539X>  
G.A. Monteiro  
<https://orcid.org/0000-0002-0193-7124>  
C.M. Melo  
<https://orcid.org/0000-0002-3191-8960>  
R.R. Maziero  
<https://orcid.org/0000-0003-0314-8409>  
M.T. Carmo  
<https://orcid.org/0000-0002-0419-9905>  
M.A. Alvarenga  
<https://orcid.org/0000-0001-8628-7310>  
P.A. Dutra  
<https://orcid.org/0000-0002-2401-2714>  
Y.F.R. Sancler-Silva  
<https://orcid.org/0000-0002-2931-6442>  
F.O. Papa  
<https://orcid.org/0000-0002-5858-8535>

### RESUMO

Avaliou-se o efeito de curvas de congelamento nos parâmetros espermáticos e na fertilidade, usando sêmen de alta e baixa congelabilidade. Experimento 1 – utilizou-se sêmen de quatro garanhões resistentes à congelamento: grupo 1, palhetas refrigeradas até 5°C e congeladas com curva de -8°C/min; grupos 2 e 3, palhetas refrigeradas até 5°C (0,5°C/min.) e congeladas com curvas de -20°C/min e -10°C/min, respectivamente. Experimentos 2 e 3 – utilizaram-se cinco garanhões (Mangalarga Marchador), respectivamente, de alta e baixa congelabilidade: grupo 4, a mesma metodologia descrita no grupo 1; grupos 5 e 6, palhetas refrigeradas até 5°C (0,5°C/min) e congeladas com curva de -20°C/min, entre 5°C e -60°C, e -10°C/min, entre -60°C e -100°C (grupo 5), e -25°C/min, de 5°C até -100°C (grupo 6). O sêmen foi avaliado após descongelamento pelo método computadorizado. No experimento 1, não houve diferença nos parâmetros avaliados. No experimento 2, os parâmetros motilidade total (MT) e motilidade progressiva foram superiores aos do grupo 6 em relação ao grupo 4. No experimento 3, a MT foi superior no grupo 6 em relação ao grupo 4. As curvas de congelamento mais rápidas apresentaram melhores parâmetros de cinética espermática, após a descongelamento, para o sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

Palavras-chave: criopreservação, espermatozoide, garanhão, Mangalarga Marchador, viabilidade espermática

### ABSTRACT

The effect of freezing curves on sperm parameters and fertility, using resistant and sensitive semen to cryopreservation, was evaluated. In experiment 1, Semen from 4 stallions resistant to freezing was used: Group 1, straws were cooled to 5°C and frozen with a curve of - 8°C/min; Groups 2 and 3, straws were cooled to 5°C (0.5°C/min) and frozen with curves of - 20°C / min and - 10°C/min, respectively. In experiments 2 and 3, 5 stallions (Mangalarga Marchador) presenting respectively resistant and sensitive sperm to cryopreservation were used: Group 4, same methodology described for Group 1 was performed; Groups 5 and 6, straws were cooled to 5°C (0.5°C/min) and frozen with a curve of - 20°C/min. between 5°C and - 60°C and -10°C/min. between - 60°C and - 100°C (Group 5) and - 25°C/min. 5°C to - 100°C (Group 6). Thawed-semen was evaluated by the computerized method CASA. In Experiment 1, there was no difference in the evaluated parameters. In Experiment 2, total motility (MT) and progressive motility (PM) were higher in Group 6 compared to Group 4. In Experiment 3, TM was higher in Group 6 than Group 4. The faster freezing curves showed better parameters of sperm kinetics after thawing, for the Mangalarga Marchador stallion semen.

Keywords: cryopreservation, spermatozoa, stallion, mangalarga marchador, sperm viability

Recebido em 29 de janeiro de 2018

Aceito em 11 de julho de 2018

\*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: monteiroga@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

Os avanços alcançados na congelação e na inseminação artificial com sêmen congelado equino trouxeram como vantagens menor custo de transporte, disponibilidade do sêmen, melhor programação da inseminação e menor risco na transmissão de doenças venéreas. No entanto, é sabido que as inseminações artificiais utilizando sêmen congelado ainda resultam em menores taxas de fertilidade, quando comparadas aos resultados com sêmen a fresco ou resfriado (Watson, 2000; Alvarenga *et al.*, 2016).

A faixa crítica de temperatura para os espermatozoides no processo de congelação é de -3°C e -10°C; nesse momento, ocorre a formação de cristais de gelo e a liberação do calor latente de fusão, o qual acarreta aumento de temperatura do sistema e as maiores injúrias celulares. Assim, a velocidade de congelação nesse período deve ser a mais rápida possível (Chaveiro *et al.*, 2006). Durante essa faixa crítica, existe mudança no gradiente osmótico entre os meios intra e extracelular, alterando o equilíbrio, e ocorre a desidratação celular. Nesse ponto, a curva de congelação deve ser lenta, para evitar a congelação da água intracelular (Alvarenga *et al.*, 2016).

A curva de congelação é importante na manutenção da integridade celular. A curva ideal deve ser lenta o bastante para permitir a desidratação suficiente da célula espermática, a fim de evitar a formação de cristais de gelo intracelular, e rápida o bastante para evitar a exposição dos espermatozoides nas soluções hipersaturadas no momento da formação dos cristais de água no ambiente extracelular (Graham, 1996; Watson, 2000; Medeiros *et al.*, 2007).

A curva de congelação tida como ótima varia entre -30 e -50°C/min na maioria das espécies animais, com resultados satisfatórios na viabilidade celular (Medrano *et al.*, 2009). No entanto, em equinos, em função de fatores individuais e raciais relacionados à resistência dos espermatozoides (Alvarenga *et al.*, 1996), a curva de congelação com melhores resultados varia entre -20 e -100°C/min (Sieme *et al.*, 2008), dependendo do método de processamento do ejaculado e do tipo de armazenamento dos espermatozoides. Assim, as máquinas de

congelação podem minimizar as variações individuais (Medrano *et al.*, 2009).

Há também fatores individuais e raciais relacionados à resistência dos espermatozoides equinos ao congelamento, já que o resultado dessa biotecnologia é bastante variável entre os ganhões (Alvarenga *et al.*, 1996; Vidament *et al.*, 1997; Samper e Morris, 1998).

Visto que a congelação de sêmen possibilita a preservação seminal de ganhões geneticamente superiores e que importância elevada é atribuída a metodologias de congelação que melhoram a viabilidade espermática, este estudo teve por objetivo avaliar a eficiência de diferentes curvas de congelação de sêmen por meio de aparelhos computadorizados em comparação à metodologia de congelação em caixa de isopor, com sêmen e ganhões de alta e baixa congelabilidade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quatro ganhões de diferentes raças (Westfallen, Hannoverano, Puro Sangue Árabe e Quarto de Milha), com idade variando entre cinco e 20 anos, resistentes ao processo de congelação. Para seleção dos animais, realizou-se coleta e congelamento de sêmen de dois ejaculados de cada animal, os quais foram classificados com alta congelabilidade quando apresentaram redução menor que 30% na motilidade total nas amostras descongeladas na curva de congelação de -8°C/min e descongeladas a 46°C por 20 segundos (Dell'Aqua *et al.*, 2001)

Seis ejaculados foram coletados de cada ganhão, com intervalo de três dias, utilizando-se vagina artificial. Os ejaculados foram diluídos 1:1 (v/v), com diluente à base de leite desnatado (Botu-Semen<sup>TM</sup>, Botupharma, Botucatu, Brasil), e centrifugados a 600 x g por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspenso com diluente de congelamento à base de gema de ovo (Botu-Crio<sup>TM</sup>, Botupharma, Botucatu, Brasil), em uma concentração final de 200 milhões de espermatozoides móveis/mL.

As amostras de sêmen foram acondicionadas em palhetas de 0,5mL e criopreservadas em três diferentes metodologias: grupo 1 (G1): as palhetas foram refrigeradas até 5°C/20 min em refrigerador comercial (Mitub<sup>TM</sup> Minitub do

Brasil Ltda., Porto Alegre, RS, Brasil) e posteriormente congeladas em vapor de nitrogênio líquido, a 6cm da superfície do nitrogênio líquido, por 20 minutos, na curva de congelamento de  $-8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; grupo 2 (G2): as palhetas foram refrigeradas até  $5^{\circ}\text{C}$  na máquina TK 3000 (TK Tecnologia em Congelamento, Uberaba, Brasil) com curva de  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e congeladas com curva de  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir  $-100^{\circ}\text{C}$ ; grupo 3 (G3): as palhetas foram refrigeradas até  $5^{\circ}\text{C}$  na máquina TK 3000 com curva de  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e congeladas com curva de  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até atingir  $-60^{\circ}\text{C}$  e a curva de  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  entre  $-60^{\circ}\text{C}$  e  $-100^{\circ}\text{C}$ .

Após o processo de congelamento, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-196^{\circ}\text{C}$  até a análise. Em todos os grupos, as palhetas foram descongeladas a  $46^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos (Dell'Aqua et al., 2001). Os espermatozoides foram transferidos para um microtubo de 1,5mL e colocados em bloco seco a  $37^{\circ}\text{C}$  para a avaliação do sêmen.

Cinco campos por amostra foram selecionados para a avaliação dos parâmetros de cinética por CASA (Computer Assisted Sperm Analysis. HTM-IVOS 12, Hamilton Thorne Research, USA). A seleção dos campos foi realizada de forma aleatória, na região central da câmara de Makler, utilizando o *setup* para espécie equina descrito por Monteiro et al. (2011). A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando-se as sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio (CFDA/PI), como descrito por Harrison e Vickers (1990).

Para avaliação da fertilidade, foi realizado um ensaio *cross-over*, com 23 éguas (46 ciclos estrais) com idade entre três e 15 anos. As éguas foram utilizadas em ciclos randomizados, em um sistema *cross-over*, que usou amostras seminais dos grupos 1 e 2. As éguas foram monitoradas diariamente por ultrassonografia transretal. Quando os folículos atingiram 35mm, a ovulação foi induzida com 1mg (i.m.) de deslorelina. Vinte e quatro horas após a indução da ovulação, as éguas foram monitoradas a cada seis horas até a detecção da ovulação. Em seguida, a inseminação foi realizada na ponta do corno uterino ipsilateral à ovulação usando-se uma pipeta flexível contendo  $800 \times 10^6$  espermatozoides móveis. A gestação foi

diagnosticada por ultrassonografia entre 12 e 15 dias após a ovulação e foi interrompida com uma aplicação de 5mg (i.m) de dinoprost trometamina.

No experimento 2, cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade variando entre cinco a 17 anos, resistentes ao processo de congelamento, foram usados. Para seleção dos animais, realizou-se coleta e congelamento de sêmen de dois ejaculados de cada animal, os quais foram classificados com alta congelabilidade quando apresentaram redução menor que 40% na motilidade total nas amostras descongeladas na curva de congelamento de  $-8^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e descongeladas a  $46^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos (Dell'Aqua et al., 2001).

No experimento 3, cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idade variando de cinco a 16 anos, com baixa resistência ao processo de congelamento, foram usados. Os animais foram classificados com baixa congelabilidade quando apresentaram redução de pelo menos 40% na motilidade total inicial nas amostras descongeladas.

Nos experimentos 2 e 3, dois ejaculados foram coletados de cada garanhão ao longo de um intervalo de três dias, usando-se vagina artificial. Ambos os ejaculados foram diluídos 1:1 (v/v) com diluente à base de leite desnatado (Botu-Semen<sup>TM</sup>, Botupharma, Botucatu, Brasil) e centrifugados a  $600 \times g$  por 10 minutos. O *pellet* foi suspenso em um diluente para congelamento à base de gema de ovo (Botu-Crio<sup>TM</sup>, Botupharma, Botucatu, Brasil), na concentração de 200 milhões de espermatozoides móveis/mL.

As amostras de sêmen foram envasadas em palhetas de 0,5mL e criopreservadas em três diferentes metodologias: grupo 4 (G4): as palhetas foram mantidas a  $5^{\circ}\text{C}/20\text{min}$  em refrigerador comercial (Minitub<sup>TM</sup>) e posteriormente congeladas em vapor de nitrogênio líquido por 20min, na curva de congelamento de  $-8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; grupo 5 (G5): as palhetas foram refrigeradas até  $5^{\circ}\text{C}$  com curva de  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  na máquina TK 3000 e congeladas a curva de  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  entre  $5^{\circ}\text{C}$  e  $-60^{\circ}\text{C}$  e  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  entre  $-60^{\circ}\text{C}$  e  $-100^{\circ}\text{C}$ ; grupo 6 (G6): as palhetas foram refrigeradas até  $5^{\circ}\text{C}$  com curva de  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  na máquina TK 3000 e congeladas com curva de  $-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $-100^{\circ}\text{C}$ . Após o

processo de congelação, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas a -196°C até a análise.

Cinco campos por amostra foram selecionados para a avaliação dos parâmetros de motilidade por CASA. A integridade da membrana plasmática foi avaliada utilizando-se as sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína e iodeto de propídio (CFDA/PI), como descrito por Harrison e Vickers (1990).

Para a análise estatística no experimento 1, foi feita a análise de variância ANOVA para se verificar a eficiência dos sistemas e das curvas de congelação na viabilidade do sêmen descongelado. O teste de Tukey foi realizado, nos casos em que houve variação, para verificar as diferenças significativas entre os grupos, e, para o teste de fertilidade, foi aplicado o teste qui-quadrado na comparação dos índices de fertilidade.

Nos experimentos 2 e 3, para a comparação entre os sistemas e as curvas utilizadas na congelabilidade do sêmen descongelado, também foi feita a análise de variância, e, nos casos em que houve variação, aplicou-se o teste de Mann-Whitney U-Statistic. Em todas as análises, os

resultados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Os espermatozoides das diferentes amostras foram avaliados quanto à motilidade total (MT), à motilidade progressiva (MP) e à integridade de membrana plasmática (IMP).

No experimento 1, não houve diferença em relação aos parâmetros de cinética espermática, integridade de membrana e fertilidade dos ganhões com alta congelabilidade ( $P > 0,05$ ) quando comparadas as diferentes curvas de congelação, como demonstrado nas Tab. 1 e 2.

No experimento 2, quando foram analisados os espermatozoides de ganhões da raça Mangalarga Marchador resistentes ao processo de congelação espermática (Tab. 3), os parâmetros MT e MP foram superiores ( $P < 0,05$ ) para os espermatozoides com a curva mais rápida de congelação (G6) em relação ao G4. Além disso, a MP foi superior no G6 quando comparado com os espermatozoides do G5. Em contrapartida, não houve diferença em relação à integridade de membrana plasmática entre os grupos testados.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão dos parâmetros espermáticos MT, MP, IMP e TC, avaliados após descongelamento, nas amostras do grupo 1 (G1) e do grupo 2 (G2) de ganhões com alta congelabilidade

Amostras	MT (%)	MP (%)	IMP (%)	TC (%)
G1	63,00±9,05	33,08±5,17	45,41±7,77	61% (14/23)
G2	67,67±10,74	33,90±9,20	48,33±7,40	65% (15/23)

Letras diferentes em uma coluna indicam diferença ( $P < 0,05$ ). MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; IMP= integridade de membrana plasmática; TC= taxa de concepção. G1= as palhetas foram mantidas a 5°C por 20min e, subsequentemente, congeladas a 6cm da superfície do nitrogênio por 20min na curva de congelação de -8°C/min; G2= as palhetas foram mantidas na curva de refrigeração de 0,5°C/min até 5°C e congeladas com uma curva de -20°C/min entre 5°C e -100°C.

Tabela 2. Médias e desvios-padrão dos parâmetros espermáticos MT, MP e IMP, avaliados após descongelamento, nas amostras do grupo 1 (G1) e do grupo 3 (G3) de ganhões com alta congelabilidade

Amostras	MT (%)	MP (%)	IMP (%)
G1	63,25±12,13	31,66±7,08	48,72±6,14
G3	65,00±8,42	32,41±3,86	50,00±5,40

Letras diferentes em uma coluna indicam diferença ( $P < 0,05$ ). MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; IMP= integridade de membrana plasmática. G1= as palhetas foram mantidas a 5°C por 20min e, subsequentemente, congeladas a 6cm da superfície do nitrogênio por 20min na curva de congelação de -8°C/min; G3= curva de refrigeração de 0,5°C/min até 5°C e congeladas na curva de -20°C/min. entre 5°C e -60°C e -100°C.

Tabela 3. Médias e desvios-padrão dos parâmetros espermáticos MT, MP e IMP, avaliados após descongelamento, nas amostras do grupo 4 (G4), grupo 5 (G5) e grupo 6 (G6) de garanhões da raça Mangalarga Marchador resistentes ao processo de congelamento espermática

Amostras	MT (%)	MP (%)	IMP (%)
G4	61,8±8,3 <sup>b</sup>	28,0±7,5 <sup>b</sup>	51,3±7,4 <sup>a</sup>
G5	66,3±4,5 <sup>ab</sup>	27,5±1,3 <sup>b</sup>	53,5±7,7 <sup>a</sup>
G6	75,0±5,5 <sup>a</sup>	41,0±7,0 <sup>a</sup>	55,0±6,3 <sup>a</sup>

Letras diferentes em uma coluna indicam diferença (P<0,05). MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; IMP= integridade de membrana plasmática. G4= as palhetas foram mantidas a 5°C por 20min e, subsequentemente, congeladas a 6cm da superfície do nitrogênio por 20min na curva de congelação de -8°C/min; G5= as palhetas foram mantidas na curva de refrigeração de 0,5°C/min até 5°C e congeladas com uma curva de -20°C/min entre 5°C e -60°C e -10°C/min entre -60°C e -100°C; G6= as palhetas foram mantidas na curva de refrigeração de 0,5°C/min até 5°C e congeladas com uma curva de -25°C/min entre 5°C e -100°C.

Conforme demonstrado na Tab. 4, não houve diferença nos parâmetros espermáticos de MP e IMP dos garanhões com baixa congelabilidade,

independentemente da curva de congelação. Entretanto, a MT dos espermatozoides do G6 foi superior (P<0,05) aos espermatozoides do G4.

Tabela 4. Médias e desvios-padrão dos parâmetros espermáticos MT, MP e IMP, avaliados após descongelamento, nas amostras do grupo 4 (G4), grupo 5 (G5) e grupo 6 (G6) de garanhões da raça Mangalarga Marchador sensíveis ao processo de congelamento espermática

Amostras	MT (%)	MP (%)	IMP (%)
G4	13,3±2,2 <sup>b</sup>	3,8±1,5 <sup>a</sup>	16,8±3,9 <sup>a</sup>
G5	19,5±5,2 <sup>ab</sup>	6,0±3,2 <sup>a</sup>	19,5±7,0 <sup>a</sup>
G6	20,5±3,3 <sup>a</sup>	6,8±3,0 <sup>a</sup>	20,8±5,4 <sup>a</sup>

Letras diferentes em uma coluna indicam diferença (P<0,05). MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; IMP= integridade de membrana plasmática. G4= as palhetas foram mantidas a 5°C por 20min e, subsequentemente, congeladas a 6cm da superfície do nitrogênio por 20 minutos na curva de congelação de -8°C/min; G5= as palhetas foram mantidas na curva de refrigeração de 0,5°C/min até 5°C e congeladas com uma curva de -20°C/min entre 5°C e -60°C e -10°C/min entre -60°C e -100°C; G6= as palhetas foram mantidas na curva de refrigeração de 0,5°C/min até 5°C e congeladas com uma curva de -25°C/min entre 5°C e -100°C.

## DISCUSSÃO

A semelhança entre os resultados das diferentes curvas (G2 e G3) testadas em relação ao controle na caixa de isopor (G1), no experimento 1, pode ser explicada pela utilização de garanhões que apresentam sêmen de alta congelabilidade. Esses achados corroboram os descritos por Papa *et al.* (2003), que não observaram diferenças na motilidade e integridade de membrana após descongelamento de espermatozoides equinos congelados a diferentes alturas do nitrogênio líquido (1, 3, 6 e 9cm) e com os achados de Clulow *et al.* (2008), que, ao compararem diferentes curvas de congelamento, não constataram diferença significativa entre os parâmetros de motilidade total e integridade acrossomal.

Assim, os resultados deste estudo demonstram que as curvas mais rápidas (máquinas) e a mais lenta (caixa de isopor) acarretam valores similares de qualidade seminal pós-descongelamento quando utilizados animais de alta congelabilidade das raças Westfallen, Hannoverano, Puro Sangue Árabe e Quarto de Milha. Possivelmente, esses valores estejam diretamente relacionados ao tipo de crioprotetor utilizado (Botu-Crio®), bem como à proporção de crioprotetor/espermatozoide. Durante a congelamento, os espermatozoides são direcionados para os canais de soluções não congeladas entre os cristais de gelo. Esses canais tornam-se progressivamente mais estreitos com a diminuição da temperatura. Portanto, quanto maior a quantidade de moléculas crioprotetoras por célula, maior a porcentagem de canais de água não congelada, ocasionando

melhor qualidade seminal pós-descongelamento (Devireddy *et al.*, 2002).

Ainda no experimento 1, não houve diferença na taxa de concepção entre as duas curvas de congelamento G1 e G2. A curva de concepção de 61% foi obtida com sêmen congelado na caixa de isopor (-8°C/min) e 65% na máquina automatizada (-20°C/min). A similaridade nos grupos experimentais pode ter ocorrido devido à utilização de garanhões com alta congelabilidade, e, portanto, ambos os grupos, independentemente da taxa de congelamento, foram eficientes em fecundar o óvulo.

Já nos experimentos 2 e 3, houve diferenças nos parâmetros espermáticos nas diferentes curvas de congelamento, quando foram utilizados garanhões da raça Mangalarga Marchador. Esse achado corrobora os relatos que demonstram maior sensibilidade dos espermatozoides dessa raça ao processo de congelamento e descongelamento seminal quando comparada a outras raças, como as germânicas e a Quarto de Milha (Alvarenga *et al.*, 2005).

A diferença de resultados obtidos no experimento 1 em relação aos experimentos 2 e 3 deve-se principalmente à utilização de garanhões da raça Mangalarga. Essa menor resistência à criopreservação espermática já havia sido reportada por Alvarenga *et al.* (2016).

Os resultados obtidos nos experimentos 2 e 3 apontam que, na raça Mangalarga Marchador, a curva de congelamento de -25°C/min entre 5°C e -100°C causa menor dano aos espermatozoides quando comparado a curva mais lenta (G4). Em concordância aos resultados apresentados, Sieme *et al.* (2008) afirmam que a curva ótima de congelamento de sêmen equino pode variar entre -20 e -100°C/min.

Apesar de as causas determinantes da variabilidade da resistência do sêmen ao processo de congelamento ainda não serem bem elucidadas, alguns estudos têm observado que essa variabilidade pode estar relacionada a fatores genéticos, reforçada por pesquisas que demonstram que quanto maior a fluidez da membrana antes da congelamento, melhor a sua resposta ao processo de criopreservação (Giraud *et al.*, 2000). Espécies que apresentam baixas concentrações de colesterol e altas concentrações

de ácidos graxos poli-insaturados são mais predispostas aos danos do choque pelo frio, já que o processo de congelamento leva ao enrijecimento da membrana plasmática (Rodrigues *et al.*, 2017).

Melhores resultados foram obtidos com a utilização de curvas de congelamento mais rápidas para animais considerados com baixa resistência ao processo de congelamento (Medeiros *et al.*, 2007). Esses resultados corroboram os relatados por Thurston *et al.* (2003), em que curva de congelamento mais rápida (-40°C/min) foi superior à curva mais lenta (-6°C/min) na eficiência da congelamento de sêmen suíno, por manter a curva de congelamento mais homogênea.

## CONCLUSÕES

A utilização de sistemas automatizados na criopreservação seminal de garanhões de alta qualidade seminal, das raças Westfallen, Hannoverano, Puro Sangue Árabe e Quarto de Milha, apresenta resultados similares nos parâmetros espermáticos e na fertilidade quando comparada ao uso do sistema convencional de caixa de isopor. O emprego de curvas de congelamento mais rápida em sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador, sensíveis e resistentes ao processo de congelamento espermática, acarreta melhores parâmetros de cinética espermática, evidenciando que curvas mais rápidas são mais indicadas para manter a viabilidade seminal na criopreservação seminal dessa raça.

## REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JR, J. The effect of breeds spermatoc parameters over equine sêmen freezability. In: SYMPOSIUM ON STALLION SEMEN, 1996, Amersfoort. *Proceedings...* Amersfoort: [s.n.], 1996. p.82.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectant for freezing stallion semen: a review. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.105-113, 2005.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; RAMIRES NETO, C. Advances in stallion semen cryopreservation. *Vet. Clin. Equine*, v.32, p.521-530, 2016.

- CHAVEIRO, A.; MACHADO, L.; FRIJTERS, A. *et al.* Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bulls sperm using two osmotic supports. *Theriogenology*, v.65, p.1875-90, 2006.
- CLULOW, J.R.; MANSFIELD, L.J.; MORRIS, L.H.A. *et al.* A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, v.108, p.298-308, 2008.
- DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S. Effects of warming rate on sperm parameters and of insemination site and dose on the fertility of equine frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, p.344-346, 2001.
- DEVIREDDY, R.V.; SWANLUND, D.J.; OLIN, T. *et al.* Cryopreservation of equine sperm: optimal cooling rates in the presence and absence of cryoprotective agents determined using differential scanning calorimetry. *Biol. Reprod.*, v.66, p.222-231, 2002.
- GIRAUD, M.N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, v.15, p.2160-2164, 2000.
- GRAHAM, J.K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.*, v.12, p.131-147, 1996.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, v.88, p.343-352, 1990.
- MEDEIROS, A.S.L.; FERREIRA, H.N.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Índices de fertilidade de espermatozoides de garanhões submetidos ao estresse osmótico por diferentes crioprotetores. *Acta Sci. Vet.*, v.3, p.35, 2007.
- MEDRANO, A.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. *Andrologia*, v.41, p.246-250, 2009.
- MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S. *et al.* Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, v.122, p.197-201, 2011.
- PAPA, F.O.; SANTOS, T.B.; MACEDO, L.P. *et al.* Influência da distância entre o nível de nitrogênio líquido e as palhetas de sêmen durante o processo de congelação sobre os parâmetros espermáticos de sêmen equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.27, p.366-370, 2003.
- RODRIGUES, P.G.; MOURA, R.S.; ROCHA, L.G.P. *et al.* Dietary polyunsaturated fatty acid supplementation improves the quality of stallion cryopreserved semen. *J. Equine Vet. Sci.*, v.54, p.18-23, 2017.
- SIEME, H.; HARRISON, R.A.P.; PETRUNKINA, A.M. Cryobiological determinants of frozen semen quality, with special reference to stallion. *Anim. Reprod. Sci.*, v.107, p.276-292, 2008.
- THURSTON, L.M.; HOLT, W.V.; WATSON, P.F. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology*, v.60, p.101-113, 2003.
- WATSON, P.F. The causes of reduce fertility with cryopreservation semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.60, p.481-492, 2000.