



Influência do tempo na fertilidade do sêmen descongelado de garanhões da raça Quarto de Milha

Influence of time on fertility of thawed semen of Quarter mile stallions

Illanna de Souza Lima Brandão¹, Antonio Brito da Silva Filho¹, Andreza Rodrigues Viana²,
Maria Madalena Pessoa Guerra¹, Jurandy Mauro Penitente Filho³, Gustavo Ferrer
Carneiro¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil; ²Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, UFape, Garanhuns, Pernambuco, Brasil; ³Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar parâmetros de qualidade seminal *in vitro* de diferentes garanhões correlacionando com o tempo, com finalidade de se obter uma técnica com maior repetibilidade, e que auxilie no incremento dos resultados no uso de sêmen congelado equino. Foram utilizadas amostras criopreservadas de sêmen de 4 garanhões da raça Quarto de Milha, em 5 repetições, submetidos a TTR nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos. Foram avaliadas a cinética espermática, a integridade de membrana e acrossômica, a morfologia espermática, e realizada comprovação de viabilidade *in vivo*. A análise dos dados foi realizada pelo Statistical Analysis System (SAS), em modelos lineares mistos com parcelas repetidas no tempo, adotando estrutura de covariância autoregressiva. E as médias comparadas pelo teste de Tukey Kramer. As correlações entre as variáveis em estudo foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. Foi observada uma interação significativa nos parâmetros Reprodutor, Tempo e interação Reprodutor x tempo ($p < 0,001$) na cinética espermática, indicando individualidade entre garanhões em termos de longevidade espermática. Essa individualidade se repetiu na integridade de membrana, onde apenas um dos garanhões manteve membrana íntegra sem diferença significativa até os 90 minutos pós-TTR, enquanto os demais reprodutores obtiveram diferença na integridade de membrana aos 30 e aos 60 minutos, respectivamente. Não houve diferença nas anormalidades espermáticas ou na integridade de acrossoma entre tempos ou reprodutores. Das éguas inseminadas 50% (5/10) apresentaram embrião ou prenhez e todas as amostras seminais apresentaram pelo menos 1 égua prenhe ou produziram embriões. O estudo demonstrou claramente a individualidade dos reprodutores e a necessidade de mais conhecimento das características seminais de longevidade espermática de cada garanhão a fim de se padronizar protocolos de IA levando-se em consideração a individualidade do garanhão para se determinar o momento mais adequado para a inseminação de acordo com o tempo da ovulação, mantendo-se índices de fertilidade favoráveis.

Palavras-chave: Equino; criopreservação; longevidade espermática.

Abstract

The aim of this study was to evaluate parameters of seminal quality in vitro of different stallions correlating with time, in order to obtain a technique with greater repeatability, and that helps to increase results in the use of frozen equine semen. Cryopreserved semen samples from 4 Quarter Horses stallions were used, in 5 replicates submitted to TTR at times 0, 30, 60, and 90 minutes. Sperm kinetics, membrane and acrosome integrity, sperm morphology were evaluated, and in vivo viability was demonstrated. Data analysis was performed by the Statistical Analysis System (SAS), in mixed linear models with plots repeated over time, adopting autoregressive covariance structure. And the means compared by the Tukey Kramer test. The correlations between the variables under study were assessed using Spearman's correlation coefficient. A significant interaction was observed also in the parameters Breeder, Time and Breeder x time interaction ($p < 0.001$) in sperm kinetics, indicating individuality between stallions in terms of sperm longevity. This individuality was observed also in the membrane integrity, where only one of the stallions preserved intact membrane without significant difference until 90 minutes after TTR, while the other breeders obtained a difference in membrane integrity at 30 and 60 minutes, respectively. There was no difference in sperm abnormalities (or acrosome integrity) among time or stallions. Of the inseminated mares 50% (5/10) presented embryo or pregnancy and all seminal samples presented at least 1 pregnant

¹Correspondência: illanna.brandao@hotmail.com

Recebido 13 de outubro de 2020

Aceito: 04 de novembro de 2023



mare or produced embryos. The study clearly demonstrated the individuality among breeders and the need for more studies on semen characteristics of sperm longevity in order to standardize AI protocols taking into account the individuality of the stallion to determine the most appropriate time for insemination according to the time of ovulation, in order to maintain favorable fertility rates

Keywords: Equine, criopreservação; sperm longevity

Introdução

Técnicas de criopreservação de sêmen representam uma importante ferramenta na conservação e disseminação genética para espécie equina, uma vez que, maximizam o uso de reprodutores que apresentam bom desempenho morfológico e funcional e formam um banco genético disponível por tempo indeterminado (Alvarenga *et al.*, 2016). Todavia, apesar de suas vantagens, esse processo possui limitações que geram entraves para sua disseminação. Algo que pode levar ao aparecimento de danos muitas vezes irreversíveis aos espermatozoides, como perda de motilidade, alterações estruturais e funcionais da membrana espermática e, conseqüentemente, diminuição do poder fecundante (Santos *et al.*, 2015).

Também é importante salientar que, no geral, variáveis como a ausência de seleção genética para características de fertilidade e a individualidade reprodutiva de cada garanhão, muitas vezes não são levadas em consideração, mas estão diretamente relacionadas a capacidade de criosobrevivência das células espermáticas. Diferenças na estabilidade espermática em relação ao processo de criopreservação podem ser observadas, resultando em dano e disfunção celular, sendo a membrana plasmática o local primário das lesões celulares oriundas de criopreservação (Sieme *et al.*, 2015).

É conhecido que o potencial de fertilização do espermatozoide depende da integridade física e funcional de sua membrana e, dessa forma, a utilização de um único teste laboratorial é incapaz de determinar a fertilidade seminal. Todavia, para se estimar a qualidade de uma amostra de sêmen, diferentes técnicas podem ser realizadas para avaliar as características físicas do ejaculado, a motilidade e longevidade dos espermatozoides e a funcionalidade e integridade estrutural das membranas espermáticas (Alvarenga *et al.*, 2016).

O conhecimento prévio da qualidade espermática dos garanhões através da utilização de testes na avaliação das injúrias permite que sejam criados protocolos de congelamento e descongelamento menos danosos as células espermáticas, ocasionando assim, minimização do impacto negativo nos índices de fertilidade (Loomis, 2001; Sieme *et al.*, 2015).

De forma geral, a avaliação da motilidade tornou-se um recurso muito utilizado para se obter informações quanto aos efeitos da criopreservação sobre a célula espermática, sendo empregada em diversos estudos com o objetivo de se comparar diluentes e diluições, métodos de resfriamento e congelamento (Loomis, 2001; Gibb, Aitken, 2016). Uma vez que, a motilidade é considerada um elemento fundamental para a fecundação, onde um dano irreversível pode representar perda da função celular. Assim, pode ser avaliada de modo subjetivo ou através do Computer *Assisted Sperm Analysis* (CASA), que tem um papel importante e crescente para a garantia da qualidade de produto de sêmen comercializados para inseminação artificial de equinos, mas também de bovinos e suínos (Amann, Waberski, 2014).

Todavia, desde 1988 o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) recomenda o emprego do teste de termorresistência (TTR), como técnica complementar, mas não menos importante, na avaliação de sêmen das diferentes espécies animais (Dimitropoulos, 1967). A longevidade dos espermatozoides diluídos e descongelados pode ser estudada através do TTR, que avalia a motilidade e o vigor espermáticos no tempo zero (momento quando o sêmen é descongelado) e pode ser dividida em TTRL (Teste de Termoresistência Lento) que consiste na incubação de uma amostra de sêmen à 38°C durante 5 horas; o TTR fisiológico (36°C/3h) e o TTR rápido (46°C/30 min). Contudo, este tipo de análise pode ser afetado pelo efeito do ejaculado método de congelamento e efeitos do tempo incubação (Aidar, 2013; Vita *et al.*, 2019).

Em vista disso, o trabalho teve como objetivo avaliar parâmetros de qualidade seminal *in vitro* de diferentes garanhões durante o teste de termorresistência, com o propósito de se obter uma técnica com maior repetibilidade, e que auxilie no incremento dos resultados no uso de sêmen congelado equino.



Material e Métodos

Obtenção e local de análise das amostras

Foram utilizadas amostras criopreservadas de sêmen de quatro garanhões da raça Quarto de Milha, de corrida, com idades entre 06 e 12 anos, oriundos do Haras Monte Verde (Sairé/PE) que foram denominados de G1, G2, G3 e G4. Todos os procedimentos envolvendo animais teve a anuência da Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE), sob licença n° 013/2019 CEUA/UFRPE. O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Andrologia (ANDROLAB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco (LABRAPE) da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFAPE).

Análises laboratoriais

Teste de termorresistência

Foram utilizadas amostras criopreservadas de sêmen de 4 garanhões da raça Quarto de Milha, em 5 repetições, submetidos a teste de termorresistência avaliando tempo 0, 30, 60 e 90 minutos.

Cinética espermática

Para determinação da cinética espermática, uma palheta de sêmen congelado de cada garanhão foi descongelada em banho-maria, à 37°C, por 30 segundos. Em seguida, um volume de 2,5 µL de cada amostra foi disposto sobre lâmina e coberta por lamínula, pré-aquecidas a 37 °C; posteriormente, as lâminas foram avaliadas por microscopia de contraste de fase e as imagens captadas por câmara de vídeo. As amostras foram avaliadas com cinco repetições cada, com intervalos distribuídos nos tempos (T), sendo o T10, considerando-se 10 minutos, o T30 de 30 minutos, T60 de 1 hora e o T90 de 1 hora e 30 minutos após o descongelamento.

As amostras foram avaliadas quanto aos padrões de movimento, observando-se cinco campos aleatórios e um número mínimo de 150 espermatozoides utilizando-se o sistema Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) (Amann, Waberski, 2014). Os parâmetros avaliados da motilidade espermática pelo sistema foram: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade de trajeto (VAP; µm/s), velocidade em linha reta (VSL; µm/s), velocidade curvilínea (VCL; µm/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm), frequência de batimentos (BCF; Hz), retilinearidade (STR; %), índice de oscilação (WOB; %); linearidade (LIN; %). O sistema CASA foi configurado com os seguintes parâmetros: temperatura - 37 °C, magnificação - 100x, imagens por segundo - 25, área de cabeça - 20 a 70 µm², VAP - lentos 10 µm/s < médios 45 µm/s < rápidos 75 µm/s, progressividade - 80% STR e movimento circular - 50% LIN.

Integridade da membrana plasmática (IMP)

Para essa avaliação, as amostras foram coradas com o método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) e Iodeto de Propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) modificado por Coletto *et al.*, 2002. Volume de 30 µL de sêmen diluídas em 150 µL de Tris (3,605 g de Tris; 2,024 de ácido cítrico; 1,488 g de frutose, 100 mL de água bidestilada; pH 6,8), contendo 5 µL de DCF (0,46 mg/mL em DMSO) e 20 µL de IP (0,5 mg/mL em PBS), incubadas por 10 minutos à 37 °C e fixadas com solução tampão fosfato salina adicionada de 0,5µL de glutaraldeído. Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em microscópio de epifluorescência, com aumento de 400x, usando filtro de imersão DBP 580-630 nm e excitação DBP 485-520 nm. Foram considerados espermatozoides com membrana intacta, os que se apresentaram marcados em verde, e com membrana plasmática danificada, os marcados em vermelho.

Integridade do acrossoma (IAC)

Para avaliação desse parâmetro, os espermatozoides foram corados com Isotiocianato de Fluoresceína conjugado a Peanutagglutina (FITC-PNA Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA) de acordo



com técnica descrita por Roth et al., (1998). Foram utilizados 5 μ L de sêmen para preparação de esfregaço, que foi seco ao ar. Foi preparada uma solução de FITC-PNA para uso com concentração final de 100 μ g/mL, a partir de uma solução estoque de FITC-PNA (1mg/mL) e PBS na proporção de 1:10.

Alíquotas (10-20 μ L) desta solução foram colocadas sobre os esfregaços, os quais foram incubados por 15 minutos em câmara úmida à 4 °C, na ausência de luz. Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em solução de PBS, refrigerada (4°C), e dispostas para secar na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 μ L de meio de montagem (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5 mg de p-phenylenediamine) foi colocado sobre a lâmina e a mesma coberta com lamínula. Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x sob óleo de imersão em microscopia de epifluorescência, usando filtro de emissão LP 515 nm e BP 450-490 nm para excitação. Os espermatozoides, foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentaram região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossomas reagidos/danificados, quando apresentaram faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática, ou não apresentaram fluorescência verde em toda região acrossômica.

Avaliação da morfologia espermática

Foram realizadas análises pelo método de câmara úmida em microscópio de contraste de fase. Na qual os espermatozoides não são corados, e a técnica microscópica é capaz de destacar os contornos celulares. Proporcionando uma melhor observação de defeitos importantes para o diagnóstico de um bom reprodutor, além daqueles relacionados com a fertilização e a formação de um futuro embrião (Reis et al., 2015).

As amostras de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37 °C, durante 30 segundos. Em seguida, depositou-se 10 μ L da amostra sobre lâmina de microscopia e cobriu-se com lamínula. Para observação de peça intermediária e cauda foi feita a diluição em formol-salina (5%) e o sêmen levado ao microscópio de contraste de fase em objetiva de imersão (aumento de 1000x) para análise, onde foram contadas 200 células espermáticas de cada amostra, contabilizando-se células normais e apenas um defeito por célula anormal. Quando observados dois ou mais defeitos na mesma célula, foi registrado em ordem de prioridade, o defeito maior em relação ao menor e, quando observados dois defeitos de mesma classificação, foi registrado apenas o de maior frequência/incidência (Araújo e Araújo, 2010; CBRA, 2013).

Viabilidade in vivo

Para avaliar a viabilidade *in vivo*, ou coleta de embriões distribuídas aleatoriamente entre os reprodutores. A ovulação das éguas foi induzida através da administração endovenosa de 1.500 UI de hCG quando apresentavam, ao exame ultrassonográfico, folículo de 35 mm e inseminadas na ponta do corno ipsilateral a ovulação, 36 horas pós-indução.

Análise estatística

Para análise dos dados, foi utilizado o Statistical Analysis System (SAS University version). Os dados em porcentagem foram submetidos à transformação angular ($Y' = \arcsen \sqrt{Y}$) e analisados em modelos lineares mistos (Mixed Procedure) com parcelas repetidas no tempo (Littell et al., 2006), de acordo com o modelo matemático: $Y_{ijk} = \mu + A_i + T_j + (AT)_{ij} + e_{ijk}$

Em que: Y_{ijkl} , resposta; μ , constante; A_i , efeito do animal; T_j , efeito do tempo; $(AT)_{ij}$, interação; e e_{ijk} , erro aleatório.

O fator de medidas repetidas foi o tempo em cada nível de coleta (animal) (subject), foi adotada estrutura de covariância autorregressiva (AR(1)). As médias (LS-means) foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer. Para maior clareza os dados foram apresentados em porcentagem.

As correlações entre as variáveis em estudo foram avaliadas pelo coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

Resultados

A avaliação de múltiplas características espermáticas em uma única amostra de sêmen com alto grau



de exatidão e repetibilidade foi realizada através do CASA. A partir das análises realizadas por esse método, foram observadas diferenças individuais entre os animais utilizados para o experimento e os tempos testados. Dessa forma, quando observado o fator tempo, constatou-se que para o garanhão G2 não houve diferença significativa em quaisquer das variáveis analisadas. O qual também se destacou dentre os demais animais, quanto a resistência e longevidade espermática.

Quando analisadas as variáveis IMP, IAC e MT, no T90 o resultado foi significativamente menor que nos tempos T0 e T30 para os garanhões G1, G3 e G4. Ao analisar os indivíduos, foi possível observar que no tempo T60 o garanhão G3 apresentou índices de IMP, IAC e MT inferiores aos observados para os garanhões G1, G2 e G4. Em contrapartida, no tempo T90, o garanhão G2 se sobressaiu em relação aos demais (Tab. 1).

Quanto a avaliação de MP, para o garanhão G3 os valores observados nos tempos T60 e T90 foram inferiores aqueles nos tempos T0 e T30. Para o garanhão G4, o índice no tempo T60 foi inferior ao do T0, e o tempo T90 inferior a todos os outros períodos. Quando analisadas as diferenças entre os animais, foi observado que os resultados obtidos para o garanhão G3 foram inferiores aos do garanhão G2 em todos os tempos estudados; e inferior ao garanhão G4 no tempo T60. Ao passo que, o garanhão G1 apresentou resposta inferior a todos os garanhões no tempo T90, e o garanhão G2, mostrou-se superior aos demais (Tab. 1).

Para as variáveis LIN, STR, WOB, VCL, VAP, ALH e BCF houve diferença entre os tempos analisados para os garanhões G3 e G4. Para o garanhão G3, os valores das variáveis nos tempos T0 e T30 foram superiores aos observados em T60 e T90. Enquanto que para o garanhão G4 os tempos T0 e T30 mostraram-se superiores apenas as do tempo T90. Quando comparado os garanhões, no tempo T60, o garanhão G3 apresentou índices inferiores a todos os outros animais. Enquanto, no tempo T90, o garanhão G1 apresentou índices inferiores aos demais animais, e o garanhão G2 foi superior a todos (Tab. 2, 3 e 4).

Na avaliação do fator VSL, foi observada uma variabilidade acentuada em relação a termorresistência das amostras espermáticas dos diferentes animais. Para o garanhão G1, os tempos T0 e T30 apresentaram resultados superiores aos do tempo T90; assim como para o garanhão G3 também os tempos T0 e T30 foram superiores aos tempos T60 e T90. Enquanto para o garanhão G4, apenas o tempo T0 foi superior ao tempo T90. Quando comparados entre si, foi observado que os garanhões G2 e G4 mostraram respostas superiores ao garanhão G3, no tempo T60. Em contraponto, no tempo T90, o garanhão G2 se mostrou superior aos garanhões G1 e G3 (Tab. 4).

No que diz respeito a morfologia das células espermáticas, as mesmas foram contabilizadas e classificadas em células normais e aquelas que apresentaram defeitos foram divididas em dois grupos, o de defeitos maiores (relacionados a cabeça, acrossoma, peça intermediária e presença de gota proximal), e defeitos menores (relacionados a alterações na cauda e presença de gota distal).

Quanto as células normais, foi observado que o garanhão G1 apresentou maior número quando comparado aos garanhões G3 ($p=0,0002$) e G4 ($p=0,0089$). E que o garanhão G2 se sobressaiu quando comparado ao garanhão G3 ($p=0,0017$). Quando avaliados os defeitos menores, constatou-se que o garanhão G4 apresentou mais defeitos que G1 ($p=0,0089$), não havendo diferença entre os demais indivíduos. E quanto aos defeitos maiores, foi constatado que o garanhão G3 apresentou a maior quantidade de células anormais em detrimento de todos os outros garanhões (G1, $p=0,0037$; G2, $p=0,0008$; e G3, $p=0,0171$) (Fig. 1).

Discussão

A longevidade e a resistência espermáticas, fatores ligados aos índices de fertilidade dos animais são características que estão possivelmente relacionados ao fator genético de resistência celular de cada indivíduo aos consequentes danos do processo de descongelamento, determinando a forma como a membrana celular interage com o crioprotetor, conferindo assim, menor ou maior proteção a mesma (Alvarenga, Papa, 2011; Alvarenga et al., 2016).

Segundo Almeida (2006) e Amorim (2008), o estresse oxidativo ao qual as células espermáticas são submetidas no processo de descongelamento, é um dos fatores que interfere diretamente no metabolismo celular, reduz a motilidade, e leva a alterações, muitas vezes irreversíveis, nas membranas plasmática e acrossomal, o que conseqüentemente, acaba reduzindo a longevidade das células espermáticas.

Além disso, Loomis e Graham (2008), afirmam que há diferenças inerentes na capacidade



Tabela 1. Valores das variáveis Integridade da membrana plasmática (IMP), Integridade do acrossoma (IAC), Motilidade total (MT) e Motilidade progressiva (MP), de acordo com o animal e o tempo (Média \pm erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).]

Animal	IMP (%)				IAC (%)				MT (%)				MP (%)			
	Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)			
	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90
G1	37,1 \pm 3,5 ^{aA}	36,6 \pm 4,4 ^{aA}	36,1 \pm 5,3 ^{aA}	0,0 ^{aB}	77,4 \pm 4,5 ^{aA}	68,0 \pm 8,8 ^{aA}	75,0 \pm 2,5 ^{aA}	16,5 \pm 16,5 ^{aB}	58,4 \pm 6,4 ^{aA}	52,7 \pm 9,0 ^{aA}	41,4 \pm 10,6 ^{aA}	9,8 \pm 9,8 ^{aB}	26,8 \pm 2,9 ^{abA}	18,9 \pm 4,9 ^{abA}	10,7 \pm 3,4 ^{abA}	3,1 \pm 3,1 ^{aB}
G2	34,0 \pm 4,0 ^{aA}	41,5 \pm 5,5 ^{aA}	34,4 \pm 2,0 ^{aA}	28,5 \pm 3,8 ^{bA}	83,2 \pm 2,1 ^{aA}	79,2 \pm 2,1 ^{aA}	82,5 \pm 1,6 ^{aA}	77,2 \pm 2,3 ^{bA}	73,7 \pm 4,3 ^{aA}	63 \pm 4,1 ^{aA}	56,4 \pm 6,3 ^{aA}	64,3 \pm 9,0 ^{bA}	47,1 \pm 3,3 ^{aA}	38,2 \pm 2,4 ^{aA}	30,5 \pm 4,9 ^{aA}	34,8 \pm 5,6 ^{bA}
G3	27,2 \pm 1,9 ^{aA}	27,1 \pm 1,1 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{aB}	78,5 \pm 4,7 ^{aA}	78,7 \pm 3,4 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{aB}	42,4 \pm 2,9 ^{aA}	35,2 \pm 3,5 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{aB}	17,7 \pm 2,8 ^{bA}	12,6 \pm 2,2 ^{bA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{aB}
G4	37,3 \pm 2,1 ^{aA}	37,7 \pm 2,2 ^{aA}	32,5 \pm 2,9 ^{aA}	0,0 ^{aB}	81,1 \pm 2,8 ^{aA}	78,4 \pm 2,4 ^{aA}	81,3 \pm 1,1 ^{aA}	0,0 ^{aB}	71,7 \pm 3,2 ^{aA}	57,3 \pm 8,5 ^{aA}	40,3 \pm 14,4 ^{aA}	16,8 \pm 10,3 ^{aB}	43,3 \pm 2,7 ^{abA}	26,3 \pm 7,3 ^{abAB}	16,5 \pm 7,5 ^{aB}	3,6 \pm 2,2 ^{aC}

G1 – Garanhão 1; G2 – Garanhão 2; G3 – Garanhão 3; G4 – Garanhão 4; T0 – Tempo zero; T30 – Tempo de 30 minutos; T60 – Tempo de 60 minutos e T90 – Tempo de 90 minutos.



Tabela 2. Valores das variáveis Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR) e Índice de oscilação (WOB), de acordo com o animal e o tempo (Média \pm erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Animal	LIN (%)				STR (%)				WOB (%)			
	Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)			
	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90
G1	65,9 \pm 2,6 ^{aA}	62,0 \pm 3,8 ^{aA}	52,7 \pm 13,9 ^{aA}	12,8 \pm 12,8 ^{aB}	82,4 \pm 2,1 ^{aA}	77,1 \pm 2,9 ^{aA}	62,9 \pm 16,0 ^{aA}	15,7 \pm 15,7 ^{aB}	80,2 \pm 1,3 ^{aA}	80,2 \pm 2,0 ^{aA}	66,6 \pm 16,8 ^{aA}	16,2 \pm 16,2 ^{aB}
G2	72,8 \pm 1,9 ^{aA}	73,2 \pm 0,7 ^{aA}	73,2 \pm 1,6 ^{aA}	71,5 \pm 2,6 ^{bA}	86,6 \pm 0,7 ^{aA}	86,9 \pm 0,6 ^{aA}	86,9 \pm 0,7 ^{aA}	84,3 \pm 1,3 ^{bA}	84,1 \pm 1,5 ^{aA}	84,3 \pm 0,3 ^{aA}	84,2 \pm 1,2 ^{aA}	82,3 \pm 1,2 ^{bA}
G3	67,9 \pm 2,1 ^{aA}	68,0 \pm 2,0 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{aB}	84,4 \pm 1,3 ^{aA}	82,9 \pm 1,2 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{aB}	80,4 \pm 1,3 ^{aA}	82,0 \pm 1,6 ^{aA}	0,0 ^{bB}	7,8 \pm 7,8 ^{aB}
G4	76,4 \pm 1,7 ^{aA}	74,7 \pm 0,5 ^{aA}	59,1 \pm 14,8 ^{aAB}	30,4 \pm 18,6 ^{aB}	89,4 \pm 0,8 ^{aA}	88,6 \pm 0,9 ^{aA}	69,3 \pm 17,3 ^{aAB}	35,4 \pm 21,7 ^{aB}	85,5 \pm 1,3 ^{aA}	84,2 \pm 1,2 ^{aA}	68,0 \pm 17,0 ^{aAB}	34,3 \pm 21,0 ^{aB}

G1 – Garanhão 1; G2 – Garanhão 2; G3 – Garanhão 3; G4 – Garanhão 4; T0 – Tempo zero; T30 – Tempo de 30 minutos; T60 – Tempo de 60 minutos e T90 – Tempo de 90 minutos.



Tabela 3. Valores das variáveis Porcentagem de células rápidas (RAP), Frequência de batimentos (BFC) e Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), de acordo com o animal e o tempo (Média \pm erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Animal	RAP (%)				BFC (Hz)				ALH (μ m)			
	Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)			
	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90
G1	9,6 \pm 0,4 ^{aA}	9,5 \pm 0,5 ^{aA}	7,2 \pm 2,0 ^{aA}	1,7 \pm 1,7 ^{aB}	2,4 \pm 0,2 ^{aA}	2,5 \pm 0,3 ^{aA}	1,7 \pm 0,5 ^{aA}	0,5 \pm 0,5 ^{bB}				
G2	9,4 \pm 0,1 ^{aA}	9,6 \pm 0,2 ^{aA}	9,4 \pm 0,4 ^{aA}	9,6 \pm 0,3 ^{bA}	2,3 \pm 0,2 ^{aA}	2,4 \pm 0,0 ^{aA}	2,4 \pm 0,1 ^{aA}	2,5 \pm 0,1 ^{aA}				
G3	8,1 \pm 1,0 ^{aA}	8,8 \pm 0,5 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{aB}	1,9 \pm 0,3 ^{aA}	2,2 \pm 0,2 ^{aA}	0,0 ^{bB}	0,0 ^{bB}				
G4	9,1 \pm 0,3 ^{aA}	9,6 \pm 0,5 ^{aA}	6,7 \pm 1,7 ^{aAB}	3,3 \pm 2,0 ^{aB}	2,2 \pm 0,1 ^{aA}	2,2 \pm 0,1 ^{aA}	1,5 \pm 0,4 ^{aAB}	0,7 \pm 0,4 ^{bB}				

G1 – Garanhão 1; G2 – Garanhão 2; G3 – Garanhão 3; G4 – Garanhão 4; T0 – Tempo zero; T30 – Tempo de 30 minutos; T60 – Tempo de 60 minutos e T90 – Tempo de 90 minutos.



Tabela 4. Valores das variáveis Velocidade curvilínea (VCL), Velocidade linear progressiva (VSL) e Velocidade média de trajetória (VAP), de acordo com o animal e o tempo (Média \pm erro-padrão da média). Para a mesma variável, na mesma linha, letras maiúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Na mesma coluna, letras minúsculas diferentes diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Animal	VCL ($\mu\text{m/s}$)				VSL ($\mu\text{m/s}$)				VAP ($\mu\text{m/s}$)			
	Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)				Tempo (Minutos)			
	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90	T0	T30	T60	T90
G1	68,4 \pm 6,0 ^{aA}	61,9 \pm 4,0 ^{aA}	42,0 \pm 11,7 ^{aA}	10,7 \pm 10,7 ^{aB}	44,6 \pm 3,0 ^{aA}	38,0 \pm 1,9 ^{aA}	26,8 \pm 7,0 ^{abAB}	6,8 \pm 6,8 ^{aB}	54,3 \pm 4,0 ^{aA}	49,4 \pm 2,4 ^{aA}	34,5 \pm 9,3 ^{aA}	8,7 \pm 8,7 ^{aB}
G2	71,7 \pm 3,4 ^{aA}	71,8 \pm 2,7 ^{aA}	64,0 \pm 5,1 ^{aA}	63,3 \pm 4,0 ^{ba}	51,6 \pm 1,6 ^{aA}	52,2 \pm 1,7 ^{aA}	46,7 \pm 3,7 ^{aA}	44,9 \pm 1,8 ^{ba}	60,2 \pm 2,2 ^{aA}	60,1 \pm 2,1 ^{aA}	52,0 \pm 3,3 ^{aA}	52,2 \pm 2,6 ^{ba}
G3	54,8 \pm 3,8 ^{aA}	50,1 \pm 2,1 ^{aA}	0,0 ^{bb}	7,8 ^{aB}	37,4 \pm 3,2 ^{aA}	34,1 \pm 1,7 ^{aA}	0,0 ^{bb}	0,0 ^{aB}	44,2 \pm 3,4 ^{aA}	41,5 \pm 1,9 ^{aA}	0,0 ^{bb}	0,0 ^{aB}
G4	63,6 \pm 3,0 ^{aA}	53,2 \pm 6,0 ^{aA}	38,9 \pm 12,5 ^{aA}	15,2 \pm 9,3 ^{aB}	52,4 \pm 4,7 ^{aA}	39,6 \pm 4,2 ^{aAB}	36,1 \pm 14,3 ^{aAB}	17,2 \pm 17,2 ^{abB}	52,6 \pm 1,7 ^{aA}	44,9 \pm 5,2 ^{aA}	31,3 \pm 9,1 ^{aAB}	14,1 \pm 8,7 ^{aB}

G1 – Garanhão 1; G2 – Garanhão 2; G3 – Garanhão 3; G4 – Garanhão 4; T0 – Tempo zero; T30 – Tempo de 30 minutos; T60 – Tempo de 60 minutos e T90 – Tempo de 90 minutos.

espermática, entre os machos, de sobreviver à criopreservação. Assim, existem particularidades não apenas entre as espécies nas taxas de sobrevivência dos espermatozoides, mas também entre indivíduos de uma mesma espécie. Essas diferenças provavelmente estejam relacionadas às características bioquímicas e metabólicas das células espermáticas, determinando assim, a capacidade de crioresistência, que por sua vez são determinados geneticamente.

Esses dados corroboram com a maioria dos estudos em sêmen equino, nos quais é possível constatar a queda dos padrões relacionados a velocidade e movimento espermáticos conforme o passar do tempo. A criopreservação e o descongelamento, promovem a cristalização da água e mudanças osmóticas no meio extracelular, resultando em alterações nos componentes da membrana plasmática, aumentando sua permeabilidade, diminuindo sua atividade metabólica, causando danos no acrossoma e em outras estruturas, alterações nas concentrações de eletrólitos intracelulares, levando a queda significativa da motilidade, e consequente perda da capacidade fecundante (Alvarenga *et al.*, 2016; Vita *et al.*, 2019).

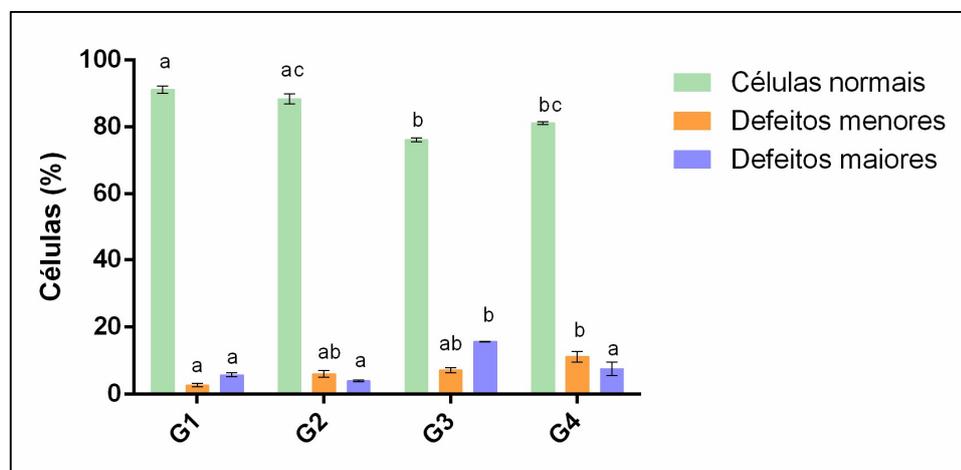


Figura 1. Morfologia de células espermáticas. Para a mesma condição morfológica, letras diferentes indicam diferença entre os animais, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G1 = Garanhão 1; G2 = Garanhão 2; G3 = Garanhão 3; G4 = Garanhão 4.

Todavia, diferentemente do observado no presente estudo, Almeida (2006), demonstrou elevada taxa nos índices de velocidade no pós-descongelamento. Podendo ser explicado pelo fato de que alguns garanhões possuem sêmen de boa congelabilidade em detrimento de outros. O que pode justificar a estabilidade observada nas amostras do garanhão G2 do presente estudo.

Segundo Muradas *et al.* (2013) e Alamaary *et al.* (2019), os padrões de motilidade e velocidade são importantes parâmetros a serem levados em consideração na avaliação de reprodutores. Uma vez que o espermatozoide necessita de uma boa MP para atingir o oviduto, encontrar e penetrar o oócito. Sendo assim, uma porcentagem de espermatozoides com boa motilidade está relacionada ao potencial fértil do sêmen. Logo, pode-se afirmar que para os animais estudados, o tempo T30 para a variável em questão é o ideal, visto que, após esse período o índice decresce, podendo assim comprometer o transporte dos gametas até o oviduto em tempo hábil para a manutenção da fertilidade dos garanhões.

Sendo assim, é possível afirmar que apesar de alguns animais terem mantido as características seminais por mais tempo que outros, o recomendável é que o tempo entre o processo de descongelamento e a utilização do sêmen seja feito em até 30 minutos, uma vez que as características gerais serão mantidas.

Além disso, outra característica que deve ser levada em consideração quando da avaliação seminal, é morfologia espermática que fornece informações adicionais à espermiogênese, e este dado é de grande valia, uma vez que os espermatozoides podem possuir boa motilidade, e ainda ter uma incidência relativamente alta de anormalidades morfológicas (Neves *et al.*, 2016).

Um reprodutor que apresenta alta taxa de espermatozoides morfolologicamente normais possui uma correlação positiva com a taxa de fertilidade. No entanto, a avaliação isolada da morfologia espermática pode não afirmar que o potencial de fertilidade de um ejaculado é alto, mas pode indicar se o potencial de fertilidade é baixo, principalmente quando houver altas porcentagens de anormalidades espermáticas. Além



disso, os garanhões podem ter muitas anormalidades espermáticas e ainda apresentar fertilidade normal (Silva *et al.*, 2017). Embora deva-se considerar que muitas anormalidades espermáticas não são contabilizadas por examinadores inexperientes.

Apesar de haver individualidade entre os garanhões estudados e do número de éguas amostradas ser limitado sugere-se que o resultado positivo encontrado para viabilidade *in vivo*, em que as fêmeas equinas apresentaram taxa de prenhez com o uso o sêmen congelado dos garanhões, seja levado em consideração, uma vez que, a maioria dos estudos de viabilidade espermática são conduzidos apenas *in vitro*, todavia as observações feitas *in vivo* podem auxiliar na observação da viabilidade espermática das amostras estudadas.

Conclusões

O estudo demonstrou a influência dos fatores tempo e individualidade de cada reprodutor nas provas as quais foram submetidos, e a necessidade de mais conhecimento das características seminais de longevidade espermática de cada garanhão a fim de se padronizar protocolos de IA mais eficientes, levando-se em consideração a individualidade do garanhão para se determinar o momento mais adequado para a inseminação de acordo com o tempo da ovulação, mantendo-se índices de fertilidade favoráveis.

Foi observado que o sêmen pode ser utilizado com segurança até o tempo T30 minutos descongelamento, uma vez que, até esse período de tempo as características seminais são mantidas sem comprometimento da fertilidade do sêmen, desde que, sejam respeitados os princípios de armazenamento e descongelamento do mesmo.

Além da taxa de prenhez, a correlação dos dados *in vitro* com os achados de provas de campo são importantes para elucidar a viabilidade do sêmen de um reprodutor, uma vez que as provas *in vitro* podem prever, com certo grau de exatidão essa viabilidade, tornando pesquisas na área promissoras.

Referências

- Aidar NB.** Criopreservação de sêmen equino. 2013. 52f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2013. Disponível em: <https://bdm.unb.br/bitstream/10483/4774/1/2013_NayaraBragaAidar.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2019.
- Alamaary MS, Haron AW, Ali M, Hiew MWH, Adamu L, Peter ID.** Effects of four extenders on the quality of frozen semen in Arabian stallions. *Veterinary World*, n. 4, v. 12, p. 34-40, 2019.
- Almeida J L.** Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino. 2006. 90f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006. Disponível em: <<https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/5069/1/Juliana%20Lopes%20Almeida.pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2020.
- Alvarenga MA, Papa FO.** Principais avanços no processamento e aplicação do sêmen congelado de equinos. *SPERMOVA*, v.1, n.1, p.7-10, 2011.
- Alvarenga MA, Papa FO, Neto CR.** Advances in stallion semen cryopreservation. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, v.32, n.3, p.521-530, 2016.
- Amann RP, Waberski D.** Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, v.81, n.1, p.5-17. e3, 2014.
- Amorim EAM.** Alteração da membrana espermática de suínos, bovinos e equinos na qualidade do sêmen. 2008. 194f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) – Universidade de Viçosa, Minas Gerais, 2008. Disponível em: <<https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/1689>>. Acesso em: 16 jul. 2020.
- Araújo AMS'A, Araújo SAC.** Alterações morfológicas encontradas nas células espermáticas de garanhões pônei. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, n. 15, ano VII, 2010. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/ZWfYtpN6RuBhs4X_2013-6-25-15-36-32.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2020.
- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA).** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte. 3ª edição, p.45-46. 2013.
- Coletto ZF, Guerra MMP, Batista AM.** Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, São Paulo, v.24, p.101-104, 2002.
- Dimitropoulos R.** La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant



du sperma congele. *Animal Medicin Veterinary*, v.4, p.215-224, 1967.

Littell RC, Milliken GA, Stroup WW, Wolfinger RD, Schabenberger O. SAS® for mixed models, 2nd edn. Cary, NC: SAS Institute Inc. p.814, 2006.

Loomis PR, Graham JK. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, n.105, p.119–128. 2008.

Loomis PR. The equine frozen semen industry. *Animal reproduction science*, v.68, n.3-4, p.191-200, 2001.

Muradas, PR, Weiss RR, Koziaki LE. Avanço na avaliação espermática de equinos: revisão. *Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais, Curitiba*, v.11, n.3, p.299-313, 2013.

Neves JGS, Guimarães JD, Freitas BW, Amorim L S. Influência da sazonalidade sobre a composição e a qualidade seminal de garanhões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte*, v.40, n.2, p.73-78, abr./jun. 2016.

Reis JR, Cavaleiro TMS, Jacomini JO. Morfologia espermática de touros nelore, pantaneiro e curraleiro avaliada de amostras coletadas diretamente dos testículos e dos epidídimos. *Horizonte Científico, Uberlândia*, v.9, n.2, 2015.

Roth TL, Weiss RB, Buff LM. Heterologous *in vitro* fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). *Biol. Reprod.*, v.58, p.475-482, 1998.

Santos MAM, Gradela A, Moraes EA, Souza WL, Alves NG, Costa JMS, Matos WCG. Características do sêmen a fresco e descongelado de garanhões da raça Nordestina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35, n.11, p.925-932, 2015.

Sieme H, Oldenhofl H, Martinsson G, Burger D, Wolkers WF. Equine semen cryopreservation: inter-individual variation, centrifugation processing, protective agents, and freezing protocols. *Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte*, v.39, n.1, p.11-14, 2015.

Silva LT, Maia MS, Aquino JJM, Moura CEB. Comparação morfológica da célula espermática equina no sêmen fresco e refrigerado. In: encontro anual da Biofísica, UFPE, 2017, Recife. *Anais eletrônicos... Recife: UFPE, 2017.* Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1081560/comparacao-morfologica-da-celula-espermatICA-equina-no-semen-fresco-e-refrigerado>>. Acesso em: 17 jun. 2020.

Vita B, Monteiro GA, Melo CM, Maziero RR, Carmo MT, Alvarenga MA et al. Influência de diferentes sistemas e curvas de congelamento na congelabilidade e fertilidade do sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.71, p.770-776, 2019.
